Über die Bestimmung von Chlor und Calcium mit der Ultramikromethode nach M. C. Sanz

Wolfgang Schreml

1962

AUS DER KINDERPOLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. Gerhard Weber

Über die Bestimmung von Chlor und Calcium mit der Ultramikromethode nach M. C. Sanz

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Schreml
aus Hof/Saale

München 1962

A. Schubert, München 5, Corneliusstr. 21 · Telefon 221777

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

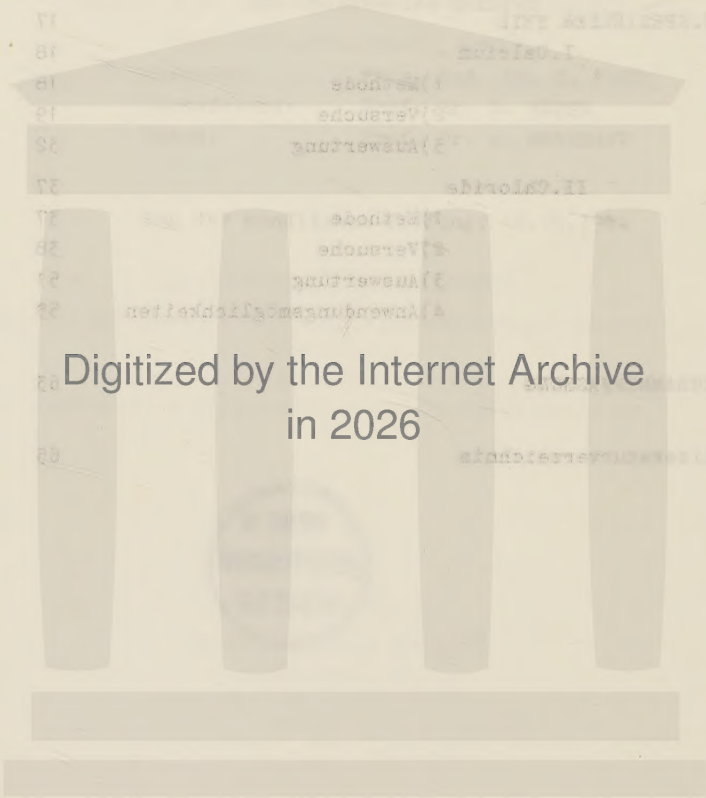
Referent:	Priv. Doz. Dr. D. VOGT
Correferent:	Prof. Dr. G. WEBER
Dekan:	Prof. Dr. A. HERRMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.1962

BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Ü B E R S I C H T

	Seite
EINLEITUNG	5
A.ALLGEMEINER TEIL	6
I.Besprechung der Literatur	6
II.Besprechung des verwendeten Systems	11
III.Eigene Erfahrungen mit dem System	14
B.SPEZIELLER TEIL	17
I.Calcium	18
1)Methode	18
2)Versuche	19
3)Auswertung	32
II.Chloride	37
1)Methode	37
2)Versuche	38
3)Auswertung	51
4)Anwendungsmöglichkeiten	55
ZUSAMMENFASSUNG	63
Literaturverzeichnis	65



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546810_0059

E I N L E I T U N G

Das klinische Labor verfügt heute über eine große Zahl bewährter Methoden,um die für den Arzt wichtigen chemischen Untersuchungen durchzuführen.Wenn trotzdem ständig neue Methoden ausgearbeitet werden,so geschieht das in dem Bestreben,die Genauigkeit zu erhöhen,den Arbeitsgang zu vereinfachen und die Probemengen zu verringern.Gerade die Entwicklung von Mikromethoden,die schon mit geringsten Mengen an Substrat eine exakte Analyse erlauben,ist zum Beispiel für die Enzymchemie oder die Stoffwechselforschung bei Einzellern von entscheidender Bedeutung.

Auch für den Arzt bieten solche Mikromethoden große Vorteile:er kann für seine Analysen Kapillarblut aus der Fingerbeere oder dem Ohrläppchen verwenden und eine,bei Säuglingen und Kindern oft sehr schwierige Venenpunktion vermeiden;er kann aus einer Blutprobe sehr vielseitige Untersuchungen anstellen und durch Mehrfachbestimmungen die Genauigkeit erhöhen.

In den letzten Jahren hat Manuel C.Sanz,Direktor am Zentrallaboratorium des Kantonspitals Genf,ein "Ultramicro Analytical System" entwickelt,das aus den oben erwähnten Gründen die Aufmerksamkeit des Pädiaters beanspruchen darf.

Die Verwendbarkeit dieser Ultramikromethode im Rahmen der Kinderklinik soll in dieser Arbeit untersucht und an zwei Methoden,der Titration von Calcium und von Chloriden, geprüft werden.

A. ALLGEMEINER TEIL

I. Besprechung des Schrifttums.

1) Begriff der Mikromethoden.

Paul L. Kirk (23) gibt für die Methoden der verschiedenen Größenbereiche folgende Begriffsbestimmung:

	Bereich	
Makromethode	1oo	mg
Semimikromethode	1o - 2o	mg
Mikromethode	1	mg
Ultramikromethode	o,oo1	mg = 1 µg

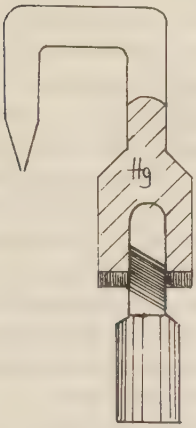
Um die häufigen Unstimmigkeiten in der Verwendung von "mikro","semimikro" und "ultramikro" zu vermeiden,schlägt Kirk die Bezeichnung "Milligrammanalyse" für Mikromethoden und "Mikrogrammanalyse" für Ultramikromethoden vor.

2) Entwicklung der Ultramikromethoden.

Um die Menge des Substrates zu verringern,können zwei Prinzipien angewandt werden:
a) Durch Verdünnung der Probe wird die Bestimmung in einen der vorhandenen Methodik zugänglichen Größenbereich verlegt. Auf diesem Prinzip veröffentlichte schon 192o Ivar Bang (3) eine Reihe "Mikromethoden zur Blutuntersuchung",bei denen er nur einige Tropfen Kapillarblut benötigte.Diese wurden auf ein Fließpapier gebracht,gewogen,und der zu untersuchende Bestandteil in reichlich Lösungsmittel ausgewaschen und bestimmt.
b) Durch die Entwicklung neuer,verfeinerter Apparaturen wird ein direktes Arbeiten im Mikro- und Ultramikrobereich ermöglicht.
Als Meßpipetten wurden zunächst fein ausgezogene Glaskapillaren entwickelt,die sich mit Hilfe von Kapillarität und Oberflächenspannung selbst füllen und einstellen. K.Linderstrøm-Lang und H.Holter (29) erreichten bei einem Volumen von 7 mm^3 eine Genauigkeit von wenigstens o,o2 mg.

Milton Levy (26) stellte für seine halbautomatischen Pipetten von 7 mm^3 Inhalt eine maximale Abweichung von 5% fest.

Abb.1



Bürette nach P.Brandt-Rehberg

P.Brandt-Rehberg (7) veröffentlichte 1925 eine Bürette für Titrationen im Mikrogrammbereich(Abb.1). Die Bürette ist rechtwinklig gebogen; die kurze,über der feinen Spitze stehende Flüssigkeitssäule wird durch Kapillarität und Oberflächen spannung gehalten.Der Austritt des Titrationsmittels wird durch Überdruck geregelt:in den mit der Bürette verbundenen Quecksilberbehälter wird ein Bolzen eingedreht;das dabei verdrängte Quecksilber preßt eine entsprechende Menge Titrationslösung aus,die am Steigen des Quecksilbermeniskus abgelesen werden kann. Diese Prinzipien:Wegfall eines Absperrhahns und Ersatz der Schwerkraft durch genau dosierbaren Überdruck, dienten als Grundlage der weiteren Entwicklung.M.P.Widmark und S.L.Örskov (59) und P.F.Scholander (44) verbesserten die Ablesegenauigkeit durch Einführung der Mikrometerschraube.P.Kirk (23) beseitigte die störende Grenzfläche Quecksilber-Titrationslösung.

Geht man bei Mikroanalysen vom Prinzip der Verdünnung aus,so liegt der zu bestimmende Stoff nur noch in geringer Konzentration vor.Die Titrationslösung muß dann ebenfalls von niedriger Konzentration sein.Dadurch wird aber die Erkennung des Umschlagpunktes erschwert und der Titrationsfehler vergrößert.Deshalb zielt die Entwicklung dahin,durch entsprechende Instrumente die Mikroanalyse in dieselben Konzentrationsbereiche zu verlegen,in denen die Makromethoden durchgeführt werden.

3)Besonderheiten der Analyse im Ultramikrobereich.

Die physiko-chemischen und technischen Besonderheiten der Mikrogrammanalysen gründen vor allem auf den Faktoren der Oberflächenphänomene,der ungewöhnlichen Konzentrationen und der möglichen Verunreinigungen.

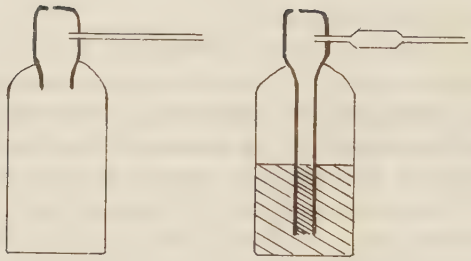
a)Oberflächenphänomene:
Mit abnehmender Flüssigkeitsmenge verschiebt sich das Verhältnis Oberfläche zu Volumen immer mehr zu Gunsten der Oberfläche.Der Quotient Oberfläche/Volumen beträgt bei einer Kugel von 1 ml Volumen $\frac{490\ qmm}{1000\ cmm} = 0{,}49\ mm^{-1}$, bei einer Kugel von 10 µl Volumen $\frac{22{,}5\ qmm}{10{,}0\ cmm} = 2{,}25\ mm^{-1}$, ist also bei dem kleineren Volumen mehr als viermal so groß. Diese relative Zunahme der Oberfläche gegenüber dem Volumen ist bei zylindrischen Flüssigkeitssäulen noch erheblich größer. Dadurch wird im Mikrogrammbereich die Oberflächenspannung so stark,daß ein Arbeiten mit normalen Glasgefäßen nicht mehr möglich ist.Nur unbenetzbar gemachtes Glas und noch besser die wasserabstoßenden Kunststoffe wie Polyäthylen,Polyvinylchlorid u.ä. ermöglichen eine genügende Reproduzierbarkeit der Pipetten und eine Mischbarkeit kleinster Flüssigkeitsmengen in den Reaktionsgefäßen.
An und unterhalb von Oberflächen werden die Moleküle sehr stark festgehalten.Daher sind Volumina im Bereich von 10 - 100 µl nur sehr schwer mischbar und stellen besondere technische Probleme.
Ein weiteres Oberflächenphänomen sehen wir in der Denaturierung von Eiweißen und in der Fermentinaktivierung.Für unsere Versuche spielt die Eiweißdenaturierung insofern eine Rolle,als sich beim Pipettieren von Plasma,Serum oder anderen eiweißhaltigen Flüssigkeiten ein feiner Proteinfilm in den Kapillaren niederschlägt.Dieser erschwert ein blasenfreies Pipettieren und muß regelmäßig mit einer Pepsin- oder Papainlösung abgedaut werden.

Um Fehler durch Verdunsten von Wasser und flüchtigen Substanzen gleichmäßig gering zu halten,ist zügiges und stets gleichbleibendes Vorgehen angezeigt.

b)Ungewöhnliche Konzentrationen:
Bei Ultramikroanalysen erhält man naturgemäß einen sehr niedrigen Flüssigkeitsspiegel,der zu einer nur geringen Lichtabsorption durch gefärbte Bestandteile führt.Daher wird eine höhere Konzentration an Indikator benötigt,die aber eine zusätzliche Fehlerquelle schafft.Nach Erreichen des Endpunktes einer Titration müssen durch weitere Zugabe von Titrationsmittel soviele Moleküle Indikator umgewandelt werden,daß ihre Farbänderung sichtbar wird.Dieser,von Kolthoff und Stenger (24) als "drop error" bezeichnete Fehler ist bei Ultramikrotitrationen mit hoher Indikatorkonzentration und geringer Schichtdicke relativ hoch;er kann aber durch Leerwert- und Standardtitration weitgehend beseitigt werden.
Auf der anderen Seite ermöglichen die neuen Ultramikrobüretten eine so genaue Ablesung,daß Titrationsmittel von hoher Normalität verwendet werden können.Dies erhöht die Schärfe des Umschlagpunktes und vermindert den Titrationsfehler.Als Beispiel sei ein Vergleich zweier Methoden der merkurimetrischen Chloridbestimmung angeführt:Sobel und Hanok (51) titrieren die Chloride aus 200 µl Serum mit einer 1/60 n $Hg(NO_3)_2$-Lösung,während bei der Ultramikromethode von M.C.Sanz die Chloride aus 10 µl Serum mit einer 1/10 n Quecksilbernitratlösung bestimmt werden.

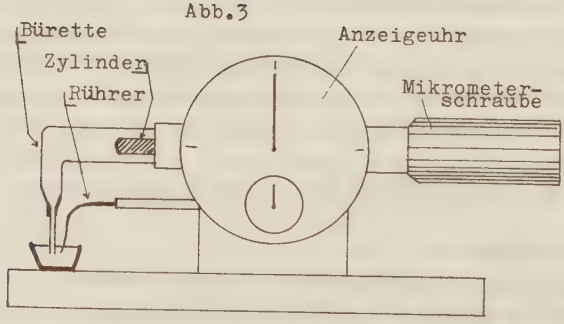
c)Verunreinigungen:
Bei den geringen Substanzmengen im Mikrogrammbereich müssen an die Sauberkeit aller verwendeten Geräte und Reagentien besonders hohe Ansprüche gestellt werden.Verunreinigungen aus der Luft durch reduzierend wirkende Staubteilchen,durch Na,K,NH_3 können störend wirken.Die Forderung geht daher nach einem staubarmen,zugluftfreien Arbeitsplatz.

Abb.2



Probepipette Reagenzpipette

Abb.3



Ultramikrotitrator

II.Besprechung des verwendeten Systems.

Im Fortgang der gezeigten Entwicklung hat Manuel C.Sanz (4o,41) ein System entwickelt,das den dargestellten Besonderheiten der Ultramikroanalyse weitgehend Rechnung trägt.Dieses "Ultramicro Analytical System" wird von der Firma Beckman/Spinco Division,Palo Alto,Calif.,auf den Markt gebracht und umfaßt ein Spektro-Colorimeter,eine Mikrozentrifuge,einen Mikrotitrator und einen Mikromischer. Außerdem für jede ausgearbeitete Methode einen "Micropak" und einen "Chempak".In den Micropaks sind alle für die betreffende Analyse notwendigen Pipetten und Reagentien zusammengefaßt;in den Chempaks ist ein Vorrat an Reagentien enthalten.
Bis jetzt sind Analysengänge für folgende Substanzen ausgearbeitet:Glucose,Harnstoff-N,Chloride,Calcium,Cholesterin, direktes und indirektes Bilirubin,anorganischen Phosphor und Gesamteiweiß.

1)Pipetten(Abb.2):

Die Pipetten sind aus unbenetzbaren Polyäthylenkapillaren hergestellt und in einem Glasdom befestigt;dieser ist einer Polyäthylenflasche aufgeschraubt und besitzt oben ein Luftloch.Verschließt man diese Öffnung mit dem Zeigefinger,so kann durch Zusammenpressen der Flasche ein Überdruck und durch Loslassen der vorher zusammengepreßten Flasche ein Unterdruck in der Kapillare erzeugt werden. Die Probepipetten werden in die Probelösung getaucht und durch Unterdruck vollgesaugt.Dabei läßt man am inneren Ende der Kapillare einen Tropfen in die Flasche abfließen. Der Überlauf hat zwei Funktionen:der Flüssigkeitsmeniskus stellt sich am inneren Ende der Kapillare genau ein;die von der vorausgegangenen Pipettierung verbliebenen Reste werden vom ersten Teil der aufgesaugten Probe gesammelt und mit dem überlaufenden Tropfen verworfen.Eine besondere Reinigung zwischen den Proben wird dadurch überflüssig.Die in der Pipette abgemessene Probe entleert man durch Überdruck in das Reaktionsgefäß.

Alle Ergebnisse werden in Bezug zu einem Leerwert und einem Standardwert ausgedrückt,und für Leerwert,Standard und Probe wird stets die gleiche Pipette verwendet.Daher kommt es nicht auf das genaue Volumen der Kapillare an,sondern nur auf deren Reproduzierbarkeit.Den Variationskoeffizienten der Probepipetten bestimmte M.C.Sanz bei einem Volumen von

5 µl mit ± o,233 %
1o µl mit ± o,2o %
2o µl mit ± o,17 %.

Bei den Reagenzpipetten dient die Polyäthylenflasche zugleich als Vorratsgefäß.Bei Druck auf die Flasche steigt Reagenzlösung durch das Steigrohr in den Glasdom.Wenn der Flüssigkeitsspiegel über dem inneren Pipettenende steht,wird die Ventilöffnung mit dem Zeigefinger verschlossen und die Reagenzlösung in die Kapillare gepreßt.Nun öffnet man das Ventil,läßt die unverbrauchte Lösung zurücklaufen und entleert die in der Kapillare abgemessene Menge in das Reaktionsgefäß.Die Reproduzierbarkeit dieser Reagenzpipetten ist nach Angaben von M.C.Sanz noch genauer,nämlich ± o,128 % bei 2,5 µl Volumen.

2)Titrierbecher,Zentrifugenröhrchen:

Die gesamte Reaktion bei der Calcium- oder Chloridtitration wird in einem Gefäß durchgeführt.Die dazu verwendeten Titrierbecher sind aus durchsichtigem,unbenetzbarem Polystyrol,von konischer Form und für die Titration von 2o - 4oo µl Flüssigkeit geeignet. Zur Gewinnung des Blutserums dienen die Mikroteströhrchen aus Polyäthylen,die mit ihrem gewulsteten Rand in die Zentrifuge eingesetzt werden können.Ihre Länge beträgt ca.4 cm,ihr Fassungsvermögen 4oo µl.

3)Mikrotitrator (Abb.3):

Die wichtigsten Teile des Mikrotitrators sind: die Bürette,der in der Bürette laufende Zylinder,die Mikrometerschraube,die den Zylinder in Bewegung setzt,das mit der Mikrometerschraube gekoppelte Anzeigewerk,das Rührwerk und der Titrationstisch.

Die Bürette ist aus Glas mit einer feinen Auslaßspitze aus Polyäthylen und hat eine Kapazität von 2oo µl.Ein mit höchster Präzision aus Kel-F hergestellter Zylinder kann durch die Mikrometerschraube in der Bürette bewegt werden; er läuft in einer Teflondichtung und berührt die Wand der Bürette nicht.Die Mikrometerschraube ist mit einer Anzeigeuhr so gekoppelt,daß eine Umdrehung des großen Zeigers einem Ausstoß von 2,oo µl Titrationslösung entspricht;da das Zifferblatt in 2oo Teilstriche unterteilt ist,beträgt die Ablesegenauigkeit 1/1oo µl.Ein kleiner Zeiger gibt die Gesamtzahl der Umdrehungen an.Die Zeiger werden vor jeder Titration durch einen Druckknopf in Nullstellung gebracht. Als Rührer taucht eine Teflonspitze in den Titrierbecher, die durch einen Vibrationsmotor angetrieben wird.Die Schwingungszahl des Vibrators ist regulierbar und muß groß genug sein, um den Inhalt des Titrierbechers in ständiger Bewegung zu halten.

4)Zentrifuge:

Zu dem System gehört eine hochtourige Zentrifuge,in der gleichzeitig bis zu 2o Mikroteströhrchen zentrifugiert werden können.An einem Schalter kann die Laufzeit eingestellt werden.Zur Trennung von Serum und Blutkuchen werden etwa 3o-45 sec.benötigt.
Da bei der Titration von Ca und Cl das Spectro-Colorimeter und der Mikromischer nicht benötigt werden,wird auf ihre Beschreibung an dieser Stelle verzichtet.

III.Eigene Erfahrungen mit dem System.

1)Blutgewinnung:

Zur Gewinnung des nötigen Kapillarblutes wurden verschiedene Möglichkeiten versucht.Am besten bewährte sich folgendes Vorgehen:

Abb.4

Vorbereitung der Mikrotesröhrchen zur Blutgewinnung.

Von dem dicken Rand eines Zentrifugenröhrchens wird ein Segment mit einer Rasierklinge so abgeschnitten, daß ein scharfer Rand entsteht (Abb.4). Die Einstichstelle an der Fingerbeere oder der Ferse wird so gelegt,daß sie nach unten zeigt und der austretende Tropfen"hängt".Reinigung und Einstich erfolgen in gewohnter Weise.Die ersten Tropfen werden mit einem trockenem Tupfer abgewischt;dann wird ein Tropfen über die Kante des Zentrifugenröhrchens gestreift und durch vorsichtiges Aufschlagen des Röhrchens nach unten gebracht.Auf der entstandenen Spur fließen die folgenden Tropfen beim Berühren der Kante von selbst zur Spitze des Röhrchens.Bei einiger Übung ist es so fast immer möglich,das austretende Blut ohne Verlust aufzufangen.Die Blutproben werden bis zur Gerinnung stehen gelassen und dann in der Ultramikrozentrifuge 15-2o sec. zentrifugiert.Schon aus einem halbgefüllten Zentrifugenröhrchen (=o,2 ml) gewinnt man genügend Serum für 5-1o Bestimmungen. Für eine Doppel- oder Dreifachbestimmung genügt ca o,1 ml Blut; nur bei Neugeborenen mit sehr hohem Hämatokritwert braucht man etwas mehr.

2)Pipettieren:

Den für die Genauigkeit des Ergebnisses entscheidenden und die längste Übung erfordernden Schritt stellt das Pipettieren dar.Dabei tauchen,zumal am Anfang,einige Schwierigkeiten auf.

Ein Rest von Benetzbarkeit bleibt auch für die verwendeten Polyäthylenpipetten bestehen. In der Kapillare bleibt ein feinster Flüssigkeitsfilm zurück, der beim darauffolgenden Pipettieren zur Blasenbildung führen kann. Die entstandenen Bläschen sitzen manchmal hartnäckig in der Kapillare fest und müssen durch kräftiges Spülen mit destilliertem Wasser entfernt werden. Die Neigung zur Bläschenbildung wird verstärkt, wenn zwischen eiweißfreien und eiweißhaltigen Lösungen gewechselt wird. Deshalb ist es von Vorteil, entweder das eiweißhaltige „Labtrol" als Standardlösung zu verwenden oder erst alle eiweißfreien Lösungen zu pipettieren und dann auf die eiweißhaltigen überzugehen. Ein Unterschied in der Reproduzierbarkeit eiweißfreier und eiweißhaltiger Lösungen bestand nicht. Nach Abdauen des Eiweißfilms in der Pipette durch eine Pepsinlösung entstehen wieder normale Verhältnisse. Die Einstellung des Flüssigkeitsmeniskus an den Enden der Kapillare wird von verschiedenen Faktoren beeinflußt, z.B. von der Größe des überlaufenden Tropfens, von der Neigung der Kapillare, von den Druckverhältnissen beim Herausgehen aus der Probe. Eine genaue Einstellung des hinteren Meniskus läßt sich durch Heben und Senken der Spitze erreichen; der vordere Meniskus stellt sich beim vorsichtigen Abwischen der Pipette durch einen von hinten nach vorn geführten Tupfer meist richtig ein. Eine genaue optische Kontrolle ist dabei nötig, die bei der derzeitigen Ausführung der Pipetten allerdings schwierig ist.

Öfter macht die quantitative Entleerung der Pipette Schwierigkeiten, indem einige Tröpfchen zurückbleiben oder bei eiweißreichen Proben der austretende Tropfen nicht abreißt, sondern zu einer Luftblase aufgeblasen wird. Dies läßt sich z.T. durch ganz langsames Entleeren, z.T. dadurch vermeiden, daß man in zwei Abschnitten erst den Hauptteil der Probe und dann einen kleinen Resttropfen auspreßt. Außerdem muß die Pipette sorgfältig sauber gehalten werden.

Für das Erreichen brauchbarer Werte ist es notwendig, alle nicht einwandfrei pipettierten Proben zu verwerfen. Dies war am Anfang rund ein Drittel der Versuche. Auch noch nach längerer Übung wurden 5-10% der pipettierten Proben ausgeschieden.

3)Titrieren:

Auf zwei Fehlermöglichkeiten sollte beim Titrieren besonders geachtet werden.Trotz der Feinheit der Auslaßspitze (ø o,2mm) findet beim Eintauchen in die Probe eine Diffusion statt,die sich besonders bei der Cl-Titration durch einen Farbumschlag in der Spitze bis zu 2-3 mm zeigt.Deshalb ist gleichmäßiges, zügiges Titrieren bis zum Endpunkt und anschließend rasches Entfernen der Bürettenspitze aus der Probe angezeigt.Vor Beginn der nächsten Titration werden o,5-1 µl Titrationsflüssigkeit entleert und abgewischt,so daß die Bürettenspitze wieder mit einwandfreier Lösung gefüllt ist.

Besondere Aufmerksamkeit ist der Meniskuseinstellung an der Bürettenspitze zu widmen.Eine noch unauffällige Veränderung von leicht konvex zu leicht konkaver Wölbung entspricht auf der Meßskala ca.4o Einheiten (=o,4 µl),das wären bei der Titration des Ca-Standards unserer Versuche 8% des Verbrauches. Eine konstante Meniskuseinstellung läßt sich am leichtesten durch ein stets gleiches Vorgehen beim Abwischen der Bürettenspitze erreichen.Genaue Kontrolle ist vor jedem Titrieren zu empfehlen.

Bei längerem Stehen des Mikrotitrators erfolgt in der Bürettenspitze eine Verdunstung,die erhebliche Konzentrationsänderungen bedingen kann.Dies läßt sich verhindern,wenn man nach Gebrauch des Titrators ein mit Titrationslösung halb gefülltes Mikrozenrifugenröhrchen so über die Bürettenspitze schiebt,daß es mit der Glaswand luftdicht abschließt.Dann kann auch nach längerem Stehen der Apparatur,z.B.über einige Feiertage,sofort weitergearbeitet werden.So zeigten die 126,in der Zeit vom 6.2.-7.3.61 titrierten NaCl-Standardwerte (=1oo mVal Cl/l) einen Variationskoeffizienten von ±1,4%.

B. S P E Z I E L L E N T E I L

Die entscheidende Frage,die der Arzt an eine klinisch-chemische Untersuchungsmethode stellt,betrifft die Zuverlässigkeit und Genauigkeit ihrer Ergebnisse.Auch ist es wichtig zu wissen,ob die Normalwerte dieser Methode denen entsprechen,die bei anderem Analysengang zu erwarten sind.Diese Fragen sollen für die Titration von Ca^{++} und Cl^{-} nach der Methode von M.C.Sanz hier untersucht werden.Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt:

1)Genauigkeit über einen Meßbereich,der die im Serum möglichen pathologischen Werte nach beiden Richtungen überschreitet,durch Reihentitrationen von Eichlösungen zunehmender Konzentration.

2)Reihentitrationen von "Labtrol",einem von der Firma Dade hergestellten Laborstandard.

3)Vergleichende Titration von
Venenblut nach einer laborüblichen Methode
Venenblut nach der Ultramikromethode
Kapillarblut nach der Ultramikromethode.

4)Mehrfachbestimmungen an Kindern im Alter von 6 Tagen - 16 Jahren mit Fehlerberechnung und Normwertbestimmung.

Die Ergebnisse wurden nach den von Gebelein und Heite (15) angegebenen Formeln ausgewertet:

$$M = \frac{x_1 + x_2 + x_3 \ldots\ldots + x_n}{n}$$

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{x_1}^{n} \cdot (M - x)^2}{n}$$

$$s = \sqrt{\frac{n}{n - m} \cdot \sigma^2}$$

$$\text{Variationskoeffizient in \%} = \frac{100 \cdot s}{M}$$

M = Mittelwert
x = Meßergebnis in Skalenteilen,bzw.in mVal/l
s = Fehlerstreuung
σ = mittlere quadratische Abweichung
n = Anzahl der Einzelmessungen
m = Anzahl der Mehrfachbestimmungen

I.Calcium

1)Methode:

Das ursprünglich zur Titration von Ca angewandte Prinzip beruht auf der quantitativen Ausfällung als Ca - Oxalat.Der Niederschlag wird abgetrennt,gewaschen und kann nun in verschiedener Weise titriert werden,z.B.direkt mit Oxydationsmitteln wie $KMnO_4$ (22,23) oder nach Umwandlung in Ca - Carbonat,jodometrisch (23).Alle diese Methoden erfordern aber eine quantitative Abtrennung des Niederschlags,die sich im Mikrogrammbereich kaum mit genügender Genauigkeit durchführen läßt.Hier führt die direkte komplexometrische Titration des Calciums weiter.Bei der Titration bildet sich ein Chelatkomplex zwischen dem Kation des zu bestimmenden Metalls und dem Anion einer als"Komplexon" bezeichneten Lösung.Die hier verwendete Aethylen - diamin - tetraessigsäure (EDTA) wurde von Schwarzenbach und Ackermann (46) eingeführt.Zur Erfassung des Umschlagpunktes wurden verschiedene Indikatoren erprobt: Murexid (47),Erichromschwarz T (6,22) und Phtaleinabkömmlinge (1).Bei all diesen Methoden mußten Nachteile in Kauf genommen werden: geringe Schärfe des Umschlagpunktes,ungenügende Spezifität in der Gruppe der Erdalkalimetalle.Sobel und Hanok (51) veröffentlichten "A Rapid Method for the Detremination of Ultramicro Quantities of Calcium and Magnesium", bei der 2o - 5o µl Serum mit EDTA und Erichromschwarz T als Indikator titriert werden.Dabei läßt sich aber nur die Summe von Ca + Mg bestimmen.

Diehl und Ellingboe (1o) erhielten durch Kondensation von Iminodiessigsäure und Fluorescin einen als "Calcein" bezeichneten Indikator,mit dem eine Titration von Calcium bei Anwesenheit von Mg - Ionen möglich ist.Der Indikator ist bei einem p_H-Wert unter 12 gelbgrün,bei p_H-Werten über 12 braun;die Verbindung Indikator - Calcium ist gelbgrün.Bei einem p_H-Wert über 12 erfolgt also ein Umschlag des Calceins von Gelbgrün nach Braun,sobald durch das EDTA die Ca - Ionen aus ihrer Bindung mit dem Indikator gelöst sind.

Mg,Sr und Ba stören die Reaktion erst bei 2o-3ofachem Überschuß.NaCl stört erst bei Konzentrationen über 2-3gr/l. Cu und Fe werden durch einen Zusatz von CN^- unschädlich gemacht.Die Originalmethode von Diehl und Ellingboe (1o) arbeitet nach der Vorschrift:
5o ml Probe,1-2 Tropfen Calcein,5ml o,1n NaOH + 1% NaCN titrieren mit einer geeichten Lösung von EDTA.

Diese Methode wurde von M.C.Sanz für den Ultramikrobereich modifiziert.Dabei wird jeweils Blindwert,Standard und Probe titriert.

Ansatz:

Blindwert	2o µl aqua dest.	+ 1oo µl 1,25n KOH + 5o mg% KCN + 1o µl Indik.
Standard	2o µl Standard-Lösung = 5 mVal Ca/l	
Probe	2o µl Probe=Serum	

Der Ansatz wird mit einer o,o2 n EDTA-Lösung titriert und der jeweilige Verbrauch in Skalenteilen von der Anzeigeuhr des Mikrotitrators abgelesen.

Der p_H-Wert der Reaktion liegt bei 14.Der Ca-Gehalt der Probe errechnet sich nach der Formel:

$$\frac{\text{Probe} - \text{Blindwert}}{\text{Standard} - \text{Blindwert}} \cdot 5 = \quad \text{mVal Ca/l}$$

Es wurde auf Ca-freie Reagenzien geachtet,so daß der regelmäßig kontrollierte Blindwert stets Null ergab.

2)Versuche:

a)Fehlerbreite über einen Meßbereich von 1 - 16 mVal Ca/l
Es wurden drei Reihen von je sechs Zehnfachbestimmungen durchgeführt.Titriert wurden geeichte wässrige Lösungen von $CaCO_3$ mit einem Calciumgehalt von 1 , 2 , 4 , 8 , 16 mVal Ca/l und die im Chempak enthaltene Standardlösung mit einem Gehalt von 5 mVal Ca/l.Die auf der Anzeigeuhr des Mikrotitrators abgelesenen Werte in Skalenteilen sind in Tabelle 1 , die Ergebnisse der Fehlerberechnung in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1

Reihe I

Nennwert mval/l	Meßwerte in Skalenteilen									
1	5o	47	45	5o	45	6o	5o	55	45	5o
2	1o2	1oo	95	1o3	98	1oo	95	1o5	1oo	97
4	198	197	195	2oo	195	2o5	2o3	195	2oo	2oo
5	252	25o	245	25o	255	248	252	25o	253	245
8	4oo	394	4oo	4o1	4oo	4oo	395	397	4o2	4o8
16	795	81o	8o5	8o2	8o5	81o	8oo	8o5	79o	81o

Reihe II

1	52	55	54	49	52	5o	45	53	5o	45
2	1o5	1oo	1o2	98	1oo	95	1o2	95	1oo	94
4	197	195	2oo	2oo	2o2	196	2o4	196	2o2	2o4
5	255	249	251	245	25o	25o	255	252	245	25o
8	395	4o5	4o5	395	4oo	4oo	395	4oo	395	395
16	795	8oo	795	795	8oo	8o5	795	79o	8oo	79o

Reihe III

1	55	57	5o	45	5o	49	5o	52	5o	46
2	1o3	1o2	97	98	1o5	95	1o2	96	1o1	97
4	198	2oo	195	197	195	196	2o5	196	199	194
5	252	253	247	248	251	248	245	251	253	249
8	4o2	395	4o4	397	4o1	395	4o5	4o2	394	398
16	8o5	8oo	797	8o3	81o	794	792	8oo	79o	797

Reihentitration geeichter Calciumlösungen von 1,2,4,8,16 mval/l und der Standardlösung 5 mval/l.

Tabelle 2

Reihe	Lösung	M	$n\sigma^2$	σ	s	Var.Koeff.
		in Skalenteilen				
I	1 mval/l	49,7	2o8,1	4,56		
II	1 "	5o,5	1o6,5	3,26	4,oo	8,o %
III	1 "	5o,4	118,4	3,44		
I	2 "	99,5	98,5	3,14		
II	2 "	99,1	114,9	3,39	3,43	3,5 %
III	2 "	99,6	1o4,4	3,23		
I	4 "	198,8	1o7,8	3,28		
II	4 "	199,6	1o4,4	3,23	3,37	1,7 %
III	4 "	197,5	94,5	3,o7		
I	5 "	25o,o	96,o	3,1o		
II	5 "	25o,2	1o5,6	3,25	3,21	1,3 %
III	5 "	249,7	76,1	2,76		
I	8 "	399,7	138,1	3,72		
II	8 "	398,5	152,5	3,91	4,o1	1,o %
III	8 "	399,3	144,1	3,8o		
I	16 "	8o3,2	4o1,4	6,33		
II	16 "	796,5	2o2,5	4,5o	5,91	o,7 %
III	16 "	798,8	337,6	5,81		

Mittelwerte und Fehlerberechnung aus den Meßwerten der Tabelle 1 . Angaben in Skalenteilen.

Aus Tabelle 2 ergibt sich,daß die Fehlerbreite s mit steigender Konzentration zunächst abnimmt und im Bereich von 5 mVal Ca/l einen tiefsten Wert erreicht,um von da ab wieder zuzunehmen.Diese Kurve beruht wohl auf zwei Fehlerquellen,die sich in entgegengesetzter Richtung auswirken:während der Pipettierfehler bei stärker konzentrierter Probe relativ weniger ins Gewicht fällt, nimmt der Titrationsfehler mit steigendem Verbrauch an Titrationsmittel zu.Aus dem absoluten Fehler ist der relative Fehler als Variationskoeffizient berechnet und in der letzten Rubrik der Tabelle 2 aufgetragen.Darnach ist zu erwarten,daß die Fehlergrenze

Tabelle 3

Sollwert mval/l	Mittelwert mval/l	Extremwerte mval/l	mittlere Abweichung in mval/l	in %	maximale Abweichung in mval/l	in %
1	0,994	1,2o	- o,oo6	=- o,6%	+ o,2o	=+ 2o %
		o,9o			- o,1o	=- 1o %
	1,o1o	1,o9	+ o,o1o	=+ 1,o%	+ o,o9	=+ 9 %
		o,9o			- o,1o	=- 1o %
	1,oo9	1,14	+ o,oo9	=+ o,9%	+ o,14	=+ 14 %
		o,9o			- o,1o	=- 1o %
2	1,99o	2,1o	- o,o1o	=- o,5%	+ o,1o	=+ 5 %
		1,9o			- o,1o	=- 5 %
	1,98o	2,1o	- o,o2o	=- 1,o%	+ o,1o	=+ 5 %
		1,88			- o,12	=- 6 %
	1,994	2,1o	- o,oo6	=- o,3%	+ o,1o	=+ 5 %
		1,9o			- o,1o	=- 5 %
4	3,976	4,1o	- o,o24	=- o,6%	+ o,1o	=+ 2,5%
		3,9o			- o,1o	=- 2,5%
	3,989	4,o8	- o,o11	=- o,3%	+ o,o8	=+ 2 %
		3,9o			- o,1o	=- 2,5%
	3,954	4,1o	- o,o46	=- 1,2%	+ o,1o	=+ 2,5%
		3,88			- o,12	=- 3 %
8	7,994	8,16	- o,oo6	=- o,1%	+ o,16	=+ 2 %
		7,88			- o,12	=- 1,5%
	7,964	8,o9	- o,o36	=- o,5%	+ o,o9	=+ 1,1%
		7,9o			- o,1o	=- 1,3%
	7,996	8,11	- o,oo4	=- o,1%	+ o,11	=+ 1,4%
		7,89			- o,11	=- 1,4%
16	16,o64	16,2o	+ o,o64	=+ o,4%	+ o,2o	=+ 1,3%
		15,8o			- o,2o	=- 1,3%
	15,917	16,o9	- o,o83	=- o,5%	+ o,o9	=+ o,6%
		15,79			- o,21	=- 1,3%
	15,995	16,22	- o,oo5	=- o,1%	+ o,22	=+ 1,4%
		15,82			- o,18	=- 1,1%

Reihentitration geeichter Calciumlösungen: Abweichung der Mittel- und der Extremwerte vom Sollwert. Die Werte sind den entsprechenden Reihen der Tab. 1 entnommen und in mVal Ca/1 umgerechnet.

2% unterschreitet, sobald der Gehalt der Probe über 4 mVal Ca/l liegt, und daß der Fehler im physiologischen Bereich unter 1,5% sinkt.

Noch eine zweite Frage soll an diese Versuchsreihe gestellt werden: wie weit stimmen die erhaltenen Werte mit den Sollwerten der Eichlösungen überein? In Tabelle 3 werden die Mittelwerte und die Extremwerte jeder Reihe mit den Sollwerten verglichen. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\frac{\text{Probe} - \text{Blindwert}}{\text{Standard} - \text{Blindwert}} \cdot 5 = \quad \text{mVal Ca/l}$$

Probe = Mittelwerte jeder Reihe (Tab.2) und Extremwerte jeder Reihe (Tab.1)

Standard = Mittelwert Standard der betreffenden Reihe (Tab.2)

Die mittlere Abweichung vom Sollwert beträgt durchschnittlich o,5%; nur ein Wert liegt über 1% (= 1,2%). Die maximale Abweichung sinkt mit steigender Konzentration und liegt bei Konzentrationen über 4 mVal Ca unter 3%

b) Reihentitration von Labtrol:

Die an wässrigen Lösungen ermittelten Werte wurden in der zweiten Versuchsreihe an Labtrol nachgeprüft. Labtrol stellt einen synthetischen Laborstandard dar, der die wichtigsten Serumbestandteile in exakter Abmessung enthält. Der Calciumgehalt beträgt 5,o mVal/l bei einer Toleranz von $\pm$o,o5 mVal/l. Es wurden fünf Reihen mit je zehn Proben titriert; um den Fehler aus dem Standardwert gering zu halten, wurden ebenfalls fünf Reihen zu je zehn Werten bestimmt. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse in Skalenteilen, Tabelle 5 die Fehlerberechnung. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der Tabelle 4 in mVal Ca/l umgerechnet, und zwar in Bezug zu $M_{Standard}$ der betreffenden Reihe; die Fehlerberechnung ist angefügt. Dabei liegen die Variationskoeffizienten zwischen o,7% und 1,1%; die Fehlerstreuung beträgt s = o,o45 mVal Ca/l, das sind o,9% des Nennwertes. Die mittleren Abweichungen streuen im Bereich von -o,8% bis +o,4%; die größte vorkommende Abweichung eines Einzelwertes entspricht 2,8%. Damit liegen alle für die Titration von Labtrol ermittelten Fehler und Abweichungen in den nach Versuch a) erwarteten Grenzen.

Tabelle 4

Standard Reihe	Meßwerte in Skalenteilen									
I	25o	25o	247	25o	248	25o	25o	25o	25o	247
II	25o	25o	25o	25o	25o	252	248	25o	245	25o
III	25o	25o	25o	245	25o	25o	25o	248	25o	246
IV	25o	253	249	25o	251	248	252	252	253	251
V	252	25o	248	252	25o	252	252	251	245	249

Labtrol										
I	245	247	248	248	248	243	249	249	245	248
II	243	249	25o	248	252	253	252	25o	251	248
III	25o	247	248	25o	251	25o	248	251	252	252
IV	247	248	249	25o	251	247	251	253	248	251
V	251	249	243	25o	248	247	248	252	247	25o

Reihentitration von Labtrol:Meßergebnisse in Skalenteilen.

Tabelle 5

Standard Reihe	M in Skalenteilen	$n\sigma^2$	σ	Var.Koeff.	s in Skalent.
I	249,2	15,6	1,25	o,5%	
II	249,5	3o,5	1,75	o,7%	
III	248,9	32,9	1,81	o,7%	1,9o
IV	25o,9	24,9	1,58	o,6%	
V	25o,1	46,9	2,17	o,9%	
Labtrol					
I	247,o	36,o	1,9o	o,8%	
II	249,6	74,4	2,73	1,1%	
III	249,9	26,9	1,64	o,7%	2,34
IV	249,5	36,5	1,91	o,8%	
V	248,5	58,5	2,42	1,o%	

Reihentitration von Labtrol:Mittelwerte und Fehlerberechnung der Meßergebnisse aus Tab.4

Tabelle 6

Labtrol

Reihe	Einzelwerte in mval/l	M	$n\sigma^2$ in mval/l	σ	s
I	4,92 4,96 4,98 4,98 4,98 4,88 5,00 5,00 4,92 4,98	4,96	0,0144	0,038	
II	4,87 4,99 5,01 4,97 5,05 5,07 5,05 5,01 5,03 4,97	5,00	0,0298	0,055	
III	5,02 4,96 4,98 5,02 5,04 5,02 4,98 5,04 5,06 5,06	5,02	0,0118	0,034	0,045
IV	4,92 4,94 4,96 4,98 5,00 4,92 5,00 5,04 4,94 5,00	4,97	0,0146	0,038	
V	5,02 4,98 4,86 5,00 4,96 4,94 4,96 5,04 4,94 5,00	4,97	0,0234	0,048	

Reihentitration von Labtrol:Ergebnisse und Fehlerberechnung in mval Ca/l.

Tabelle 7

Reihe	Mittelwert in mval/l	Extremwerte in mval/l	mittlere Abweichung in mval/l	in %	maximale Abweichung in mval/l	in %
I	4,96	5,00 4,88	-0,04	=-0,8%	0,0 - 0,12	= 0 % =-2,4%
II	5,00	5,07 4,87	0	= 0 %	+ 0,07 - 0,13	=+1,4% =-2,6%
III	5,02	5,06 4,96	+0,02	=+0,4%	+ 0,06 - 0,04	=+1,2% =-0,8%
IV	4,97	5,04 4,92	-0,03	=-0,6%	+ 0,04 - 0,08	=+0,8% =-1,6%
V	4,97	5,04 4,86	-0,03	=-0,6%	+ 0,04 - 0,14	=+0,8% =-2,8%

Reihentitration von Labtrol:mittlere und maximale Abweichungen der Meßwerte vom Nennwert des Labtrol(5,0 mVal Ca/1).

Tabelle 8

	Meßwerte in mval/l	M	$n\sigma^2$ in mval/1	σ	s
I/1	4,5 4,7 4,6 4,75	4,64	o,o369	o,o96	
II/1	5,1 4,8 5,o 4,6	4,87	o,1476	o,197	
III/1	5,o 5,o 4,8 4,7	4,88	o,o676	o,13o	
IV/1	4,8 4,7 4,6 4,5	4,65	o,o5oo	o,112	
V/1	4,9 5,o 4,7 4,8	4,85	o,o5oo	o,112	o,131
VI/1	4,5 4,6 4,5 4,8	4,6o	o,o6oo	o,123	
VII/1	4,7 4,8 4,6 4,7	4,7o	o,o2oo	o,o71	
VIII/1	5,o 4,8 4,7 4,8	4,83	o,o476	o,1o9	
IX/1	4,8 4,9 4,9 4,75	4,84	o,o169	o,o65	
X/1	5,o 5,1 5,o 4,9	5,oo	o,o2oo	o,o71	

Flammenphotometrische Calciumbestimmung in zehn Serumproben:Einzel- und Mittelwerte.

c)Vergleich von Ultramikromethode und flammenphotometrischer Bestimmung von Kapillar- und Venenblut.

In der dritten Versuchsreihe sollte die Ultramikromethode nach Sanz mit einer laborüblichen Methode - der flammenphotometrischen - verglichen werden.Weiter wurde das Kapillarblut und das Venenblut auf Differenzen im Calciumgehalt geprüft.Das Blut wurde von zehn Erwachsenen im Alter von 2o-25 Jahren gewonnen.Es wurden zunächst 1o-15 cm^3 Blut aus der Vena cubitalis und anschließend ein Mikroteströhrchen Kapillarblut aus einer Fingerbeere der anderen Hand entnommen.Im einzelnen wurden folgende Bestimmungen ausgeführt:

aus dem Venenblut: 4-fach Bestimmungen mit dem Flammphotometer von Netheler und Hinz

aus dem Kapillarblut: 5- oder Mehrfachbestimmungen mit der Ultramikromethode.

In den folgenden Tabellen bedeuten:

I,II ..... X = Versuchspersonen
1 = Venenblut flammenphotometrisch
2 = Venenblut nach der Ultramikromethode
3 = Kapillarblut nach der Ultramikromethode

Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse der flammenphotometrischen Bestimmung in mVal/l;außerdem die zugehörige Fehlerberechnung.Bei der Titration nach Sanz wurde zu jeder Probe ein Blindwert und ein Standard titriert.Der Blindwert ergab einheitlich o;die 2o

Tabelle 9

	Einzelwerte in mval/1	M	$n\sigma^2$ in mval/1	σ	s
I/2	4,78 4,78 4,78 4,81 4,74 4,82 4,86 4,8o 4,82 4,88	4,81	o,o137	o,o37	
I/3	4,84 4,8o 4,8o 4,78 4,7o 4,83 4,76	4,79	o,o134	o,o44	
II/2	4,86 4,78 4,88 4,76 4,82 4,82 4,82 4,78 4,96 4,82	4,83	o,o3o6	o,o55	
II/3	4,7o 4,8o 4,78 4,8o 4,74 4,74 4,83 4,78	4,77	o,o123	o,o39	
III/2	4,72 4,72 4,82 4,7o 4,76	4,74	o,oo92	o,o43	
III/3	4,68 4,62 4,76 4,68 4,66	4,68	o,oo94	o,o43	
IV/2	4,88 4,84 4,84 4,92 4,94	4,88	o,oo84	o,o41	
IV/3	4,9o 4,86 4,88 4,92 4,8o	4,87	o,oo85	o,o41	
V/2	4,78 4,84 4,76 4,86 4,78	4,8o	o,oo76	o,o39	o,o52
V/3	4,76 4,88 4,82 4,8o 4,82	4,82	o,oo76	o,o39	
VI/2	4,8o 4,76 4,84 4,72 4,8o	4,78	o,oo84	o,o41	
VI/3	4,76 4,7o 4,7o 4,66 4,82	4,73	o,o157	o,o56	
VII/2	4,9o 4,88 4,86 4,94 4,88	4,89	o,oo37	o,o27	
VII/3	4,86 4,86 4,82 4,68 4,86	4,82	o,o244	o,o7o	
VIII/2	4,9o 4,92 4,94 4,94 4,8o	4,9o	o,o136	o,o52	
VIII/3	4,86 4,96 4,82 4,96 4,94	4,91	o,o165	o,o57	
IX/2	4,9o 4,9o 4,94 4,86 4,8o	4,88	o,o112	o,o47	
IX/3	4,9o 4,88 4,88 4,8o 4,92	4,88	o,oo84	o,o41	
X/2	4,96 4,96 5,o2 4,84 4,94	4,94	o,o172	o,o59	
X/3	4,96 4,9o 5,o4 4,86 5,oo	4,95	o,o213	o,o65	

Ultramikrotitration von Calcium im Venenblut(2) und im Kapillarblut(3) von zehn Probanden (I-X).

Standardwerte ergaben ein Mittel von 249,6 Skalenteilen bei einer mittleren quadratischen Abweichung von $\sigma = \pm 1{,}24$ Skalenteilen, entsprechend einem Var.Koeff.von o,5%. Die Titrationsergebnisse der Serumproben sind in Bezug auf $M_{Standard}$ berechnet und die erhaltenen Werte mit Fehlerberechnung in Tabelle 9 aufgetragen. Die Fehlerstreuung liegt bei der Ultramikromethode mit $s = \pm o{,}o52$ mVal Ca/l bei $\pm$ 1,1% (bezogen auf den niedrigsten Mittelwert); die Fehlerstreuung der flammphotometrischen Bestimmung ergibt $s = \pm o{,}131$ mVal Ca/l, entsprechend $\pm$ 2,8%.

Tabelle 1o

	M_1	M_2	M_3	$M_2 - M_1$		$M_3 - M_2$	
	mval/l			mval/l	% von M_2	mval/l	in % von M_3
I	4,64	4,81	4,79	+o,17	=3,5%	-o,o2	=o,4%
II	4,87	4,83	4,77	-o,o4	=o,8%	-o,o6	=1,3%
III	4,88	4,74	4,68	-o,14	=3,o%	-o,o6	=1,3%
IV	4,65	4,88	4,87	+o,23	=4,7%	-o,o1	=o,2%
V	4,85	4,8o	4,82	-o,o5	=1,o%	+o,o2	=o,4%
VI	4,6o	4,78	4,73	+o,18	=3,8%	-o,o5	=1,1%
VII	4,7o	4,89	4,82	+o,19	=3,9%	-o,o7	=1,5%
VIII	4,83	4,9o	4,91	+o,o7	=1,4%	+o,o1	=o,2%
IX	4,84	4,88	4,88	+o,o4	=o,8%	o	o %
X	5,oo	4,94	4,95	-o,o6	=1,2%	+o,o1	=o,2%

Vergleich der Calciumwerte im Venenblut(M_1:flammenphotometrisch bestimmt;M_2:nach der Ultramikromethode titriert)und im Kapillarblut(M_3:nach der Ultramikromethode titriert)bei zehn Probanden.

Welche Unterschiede zwischen den Mittelwerten der drei verschiedenen Bestimmungen bestehen,zeigt schließlich Tabelle 1o.Die Calciumwerte des Venenblutes nach den beiden verschiedenen Methoden zeigen Abweichungen von - o,14 bis + o,23 mVal Ca/l;doch liegen nur zwei Werte (IV,VII) höher als die Summe der Fehlergrenzen beider Methoden:

$s_{\text{flammenphotometrisch}}$ o,131 mVal Ca/l

$s_{\text{ultramikrometrisch}}$ +o,o52 mVal Ca/l

o,183 mVal Ca/l

Ein signifikanter systematischer Unterschied besteht nicht.Die Reproduzierbarkeit der Ultramikromethode ist erheblich besser;dazu trägt schon die größere Ablesegenauigkeit des Titrators bei: ein Skalenteil des Mikrotitrators entspricht o,o2 mVal Ca/l gegenüber 1 Skalenteil des Flammenphotometers = 0,1 mVal.

Die Werte,die sich nach der Ultramikromethode für das Venenblut und das Kapillarblut ergeben,unterscheiden sich im Mittel um±o,6%, maximal um-1,5%;der Calciumgehalt des Venen- und Kapillarblutes zeigt also nach der Methode von M.C.Sanz gute Übereinstimmung.

d)Normalwerte bei Kindern:

Nachdem die vorausgehenden Untersuchungen eine genügende Genauigkeit der Methode ergeben haben,sollen als Letztes die Normalwerte des Serumcalciums bei Kindern im Alter von 6 Tagen bis zu 16 Jahren untersucht werden.Das Blut wurde morgens zwischen 8 und 9 Uhr abgenommen,bei jungen Säuglingen aus der Ferse,bei älteren Kindern aus der Fingerbeere.Es wurden im Durchschnitt 4 - 5 Proben jeden Serums titriert,dazu jeweils 1 - 2 Standard.Die Titrationsergebnisse wurden in bezug zu dem mittleren Standard eines Titrationsvorganges gesetzt,bei dem mindestens 4 verschiedene Seren und entsprechend viele Standardwerte titriert wurden.

Die 90 dabei erhaltenen Standardwerte ergaben bei einem Mittel von M= 248 Skalenteilen eine mittlere quadratische Abweichung = $\pm$ 1,7 SkT, entsprechend $\pm$ 0,7 %. Die berechneten Calciumwerte in mval/1 und die Berechnung der Fehlerstreuung s sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die Fehlerstreuung beträgt s = $\pm$ 0,052 mval/1, dies ergibt - auf den Mittelwert m = 4,86 Ca/1 bezogen - einen Variationskoeffizienten von $\pm$ 1,1 %.
Abweichung für folgende Altersgruppen berechnet:

I : 1.Lebensmonat
II : 2. + 3.Lebensmonat
III : 4. -12.Lebensmonat
IV : 2. + 3.Lebensjahr
V : 4. - 6.Lebensjahr
VI : 7. -16.Lebensjahr

Die Mittelwerte der Altersgruppen I - V liegen im Bereich von 4,81 - 4,84 mVal Ca/l nahe beieinander.Es bestand bei den untersuchten Kindern bis zu 6 Jahren kein altersbedingter Unterschied des Serumcalciumspiegels.Für diese Altersgruppen beträgt der gemeinsame Mittelwert 4,82 mVal Ca/l,die mittlere quadratische Abweichung $\pm$ o,15 mVal/l.

Für die Kinder über 6 Jahre ergibt sich ein höherer Mittelwert von 5,oo $\pm$ o,21 mVal Ca/l.In dieser Gruppe liegen 5o% der Werte

Tabelle 11

		Alter J	M	T	Einzelwerte in mval/l	M in mval/l	n^2
I	1			6	4,86 4,81 4,86 4,77	4,83	o,oo58
	2			12	4,92 4,71 4,88 4,76	4,82	o,o293
	3			13	4,87 4,89 4,81 4,83 4,79	4,84	o,oo69
	4			16	4,76 4,8o 4,8o 4,74 4,76 4,74	4,77	o,oo38
	5			16	4,83 4,87 4,81 4,85 4,81	4,83	o,oo28
	6			2o	4,71 4,71	4,71	o,o
	7			21	5,o5 5,o5 5,11 5,15 5,o3	5,o8	o,o1o1
II	8		1	5	4,85 4,65 4,75 4,79	4,76	o,o212
	9		1	14	4,86 4,98 5,o2 5,o8 4,98	4,98	o,o26o
	1o		2	14	4,72 4,72 4,7o 4,82 4,66	4,72	o,o14o
	11		2	17	4,76 4,78 4,72 4,73 4,82 4,76	4,76	o,oo65
	12		2	21	4,95 4,91 4,91 4,89 4,89 4,93	4,91	o,oo28
	13		3		4,68 4,68 4,68 4,76	4,7o	o,oo48
III	14		4	18	5,21 5,19 5,11 5,17 5,19	5,17	o,oo6o
	15		4	2o	4,8o 4,78 4,82 4,78 4,82 4,72 4,76 4,78	4,78	o,oo76
	16		5	16	4,74 4,82 4,82 4,72 4,64	4,75	o,o229
	17		5	2o	4,82 4,9o 4,8o 4,74 4,84	4,82	o,o136
	18		6	12	4,79 4,79 4,75 4,77 4,79 4,77	4,78	o,oo14
	19		7	6	4,94 4,9o 4,98 4,94 5,oo	4,95	o,oo61
	2o		7	1o	4,85 4,85 4,77 4,93 4,85	4,85	o,o128
	21		8		4,82 4,86 4,9o 4,78 4,92	4,86	o,o132
	22		9	11	4,55 4,49 4,39 4,41 4,35	4,44	o,o261
IV	23	1	1	6	4,76 4,78 4,86 4,72 4,75	4,77	o,o112
	24	1	1	18	4,92 4,96 4,92 4,88 4,92 4,92	4,92	o,oo32
	25	1	11	21	5,o4 5,o6 5,o6 5,o2	5,o5	o,oo12
	26	2	2		5,oo 4,98 4,86 5,oo 4,94	4,96	o,o14o
	27	2	2		4,87 4,75 4,85 4,65	4,78	o,o3o8
	28	2	2	6	4,83 4,83 4,77 4,91 4,81 4,83	4,83	o,o1o4
	29	2	3		4,94 4,84 4,98 4,9o 5,o6	4,94	o,o276
	3o	2	4	11	4,71 4,75 4,69 4,71 4,67 4,71	4,71	o,oo36
	31	2	5	18	5,o6 5,oo 5,o1 4,98	5,o1	o,oo35
	32	2	8		4,48 4,4o 4,43 4,45 4,51	4,45	o,oo74

Tabelle 11

Fortsetzung

	Alter J	M	T	Einzelwerte in mval/l	M in mval/l	n^2
V 33	3		18	4,87 4,95 4,93 5,01 4,95	4,94	0,0101
34	3	5		4,84 4,74 4,82 4,84 4,88	4,82	0,0108
35	3	10		4,55 4,53	4,54	0,0002
36	4	2	12	4,79 4,95 4,91 4,89	4,89	0,0140
37	5	8		4,86 4,90 4,80	4,85	0,0051
38	5	10		5,07 5,01 5,01 5,01 4,99	5,02	0,0037
VI 39	6	4		4,87 4,93 4,89 4,87 4,93	4,90	0,0037
40	7	9	20	5,18 5,20 5,20 5,24 5,18	5,20	0,0024
41	7	11		5,43 5,23 5,24 5,41 5,43	5,35	0,0429
42	8	2		4,85 4,89 4,91 4,91	4,89	0,0024
43	9	8	24	5,19 5,17 5,17 5,19 5,06	5,16	0,0120
44	9	10		5,22 5,22 5,14	5,19	0,0043
45	10	2		5,03 5,01 4,97 5,05 5,03	5,02	0,0037
46	10	7		4,75 4,81 4,65 4,75 4,61	4,71	0,0268
47	12			5,19 5,25 5,23 5,15 5,23	5,21	0,0076
48	13	11	13	4,92 4,88 4,94 4,82 4,88	4,89	0,0085
49	14	2		4,68 4,64 4,64 4,62 4,68	4,65	0,0029
50	16	1	18	4,82 4,78 4,90 4,84 4,82	4,83	0,0077

$\Sigma n\sigma^2 = 0,5254$

$s = 0,052$

Serumcalciumwerte von 50 Kindern in 6 Altersgruppen(I - VI): Einzelwerte,Mittelwerte und Berechnung des methodischen Fehlers.

Tabelle 12

Mittelwerte und mittlere quadratische Abweichung

	einzelne Altersgruppen	Gruppe I-V und VI	alle Gruppen
I	4,84 ± o,11 mval/l	4,83 ± o,15 mval/l	4,87 ± o,18 mval/l
II	4,81 ± o,1o "		
III	4,82 ± o,18 "		
IV	4,84 ± o,17 "		
V	4,84 ± o,15 "		
VI	5,oo ± o,21 "	5,oo ± o,21 "	

Serumcalciumwerte der Altersgruppen in Tab.11

über 5,oo mVal Ca/l,während es bei den Kindern unter 6 Jahren nur 13% sind.Eine statistisch signifikante Differenz läßt sich nicht errechnen,da die Unterschiede im Verhältnis zur mittleren quadratischen Abweichung zu gering sind.Deshalb kann auch der gemeinsame Mittelwert aller Altersgruppen als Normalwert der verwendeten Methode betrachtet werden.Er beträgt:4,86 ± o,2o mVal Ca/l. In diesem Bereich lagen 8o% der gemessenen Werte.
Die gefundenen Extremwerte betrugen: 4,44 mVal Ca/l- 5,35 mVal Ca/l.

3)Auswertung der Versuche:

a)Reproduzierbarkeit:

Im Bereich physiologischer Blutcalciumwerte liegt die Fehlerstreuung der Methode zwischen 1,1% und 1,3%.Die Titration des Standards weist einen Fehler von ca. 1% auf.Damit sich die beiden Fehler nicht summieren,ist eine Mehrfachbestimmung des Standards nötig.Dadurch lassen sich auch Fehler durch Verunreinigungen und Alterung von Reagenzien ausschalten.Der Standardwert schwankt bei sauberem Arbeiten auch während längerer Zeit nur geringfügig.Eine zusätzliche Fehlerquelle tritt auf,wenn die Reagenzien durch Ca verunreinigt sind.Denn die Titration des Blindwertes erreicht bei der niedrigen Calciumkonzentration keine

befriedigende Reproduzierbarkeit.Als während der Versuche die Kalilauge erneuert wurde,ergab sich bei der Titration des Blindwertes ein Calciumgehalt entsprechend 37 Skalenteilen mit einer mittleren quadratischen Abweichung $\sigma = \pm 1{,}7$ Skalenteilen;das entspricht einem Variationskoeffizienten von $\pm$ 4,5%.Deshalb wurde auf calciumfreie Reagentien geachtet,die regelmäßig einen Blindwert = Null ergaben.

b)Spezifische Fehlerquellen:

Der verwendete Indikator Calcein besitzt eine relativ breite Zone des Farbumschlags;die Beurteilung des Umschlagspunktes gelingt erst nach längerer Übung.Dabei kann die Eigenfärbung des Blutes erheblich stören.Es ist nicht möglich,hämolytisches Serum exakt zu titrieren;der Farbumschlag tritt früher auf, der Umschlagspunkt ist undeutlich.Noch ungünstiger wirkt sich eine höhere Bilirubinkonzentration im Serum aus.Der Indikator behält dann einen Stich ins Grüne bei,sodaß ein Umschlagspunkt kaum definiert werden kann.Daher konnten einige Seren von Neugeborenen mit Ikterus neonatorum nicht auf ihren Calciumgehalt geprüft werden.

Eine weitere,allerdings vermeidbare Fehlerquelle wird durch den hohen p_H-Wert von annähernd 14 bedingt,bei dem die Titration durchgeführt werden muß.Hierbei kann ein Teil des Calciums als Hydroxyd gefällt werden und so zunächst der Titration entgehen.Bei solchen,nicht zu Ende titrierten Lösungen wird nach einiger Zeit wieder Calcium frei und der Farbumschlag des Indikators geht zurück.Dieser Fehler läßt sich vermeiden, wenn man auf eine bestmögliche Durchmischung der Probe achtet, damit sich kein $Ca(OH)_2$ absetzen kann,und wenn man einen günstigen,empirisch gefundenen Rhythmus während des Titrationsvorganges einhält.

In mehreren Versuchsreihen zeigte es sich,daß längeres Stehen des Serums mit KOH den Fehler erhöht;auch zu zögerndes Vorgehen bei der Titration begünstigte offensichtlich den Ausfall von $Ca(OH)_2$. Am besten bewährte sich folgendes Vorgehen:Blindwert,Standard und Proben werden in die Mikrotitrationsbecher pipettiert;der Mikrotitrator wird für die Titration hergerichtet;KOH und Indikator werden zu einer Probe gegeben und diese sofort titriert,dabei erfolgt die Zugabe von EDTA zügig,bis sich der Umschlagspunkt durch Abblassen der Indikatorfarbe andeutet,dann wird langsam zu Ende titriert; der Mikrotitrator wird für die nächste Titration hergerichtet. Der Zeitaufwand ist bei diesem Vorgehen nur wenig größer,als wenn man die KOH und den Indikator serienmäßig zu allen Proben gibt,da Pipetten und Reagenz stets als griffbereite Einheit zur Verfügung stehen.Dabei hat man noch den Vorteil,daß die zeitlichen Bedingungen der Reaktion konstant bleiben.

c)Zeit- und Arbeitsaufwand:

Die Ultramikromethode bietet an verschiedenen Stellen eine erhebliche Einsparung an Zeit und Arbeit.

Die Abnahme des Kapillarblutes erfordert weniger Vorbereitungen und ist rascher und leichter durchzuführen als eine Venenpunktion.Das Zentrifugieren des Blutes dauert nur $\frac{1}{4} - \frac{1}{2}$ min.;ein Abpipettieren des Serums ist nicht nötig. Die Analyse erfordert nur wenige Arbeitsgänge;der Zeitaufwand hängt sehr von der Geschicklichkeit und Übung des Titrierenden ab.2o Einzelanalysen dauerten durchschnittlich $1 - 1\frac{1}{4}$ Std.,das sind rund 3 Minuten für eine Probe.Auch bei der Reinigung wird Zeit und Arbeit gespart,da nur die Probepipetten einer regelmäßigen Behandlung mit Pepsinlösung bedürfen.Mikroteströhrchen und Titrationsbecher werden nur einmal verwendet.Die Bürette des Mikrotitrators braucht nur beim Übergang zu einer anderen Titrationslösung gründlich gereinigt zu werden.

d)Normalwerte:

Für den Blutcalciumspiegel von Kindern ohne klinische Zeichen von Störungen im Calciumstoffwechsel ergaben sich folgende Werte nach der Ultramikromethode:

Alter	Mittelwerte	Extremwerte
bis 6 Jhr.	4,82 ± o,15 mVal/l	4,44 - 5,17 mVal/l
über 6 Jhr.	5,oo ± o,21 mVal/l	4,65 - 5,35 mVal/l
gesamt	4,87 ± o,18 mVal/l	4,44 - 5,35 mVal/l

Der Calciumspiegel der Kinder liegt nach Untersuchungen von Siwe (48) höher und ist stärkeren Schwankungen unterworfen als beim Erwachsenen.Schon lange ist eine Abhängigkeit des Serumcalciumspiegels von der Jahreszeit bekannt (Bakwin 1927 (4,5),Todd (54)).Tabelle 13 bringt einen Ausschnitt aus den in der Literatur angegebenen Normalwerten für den Blutcalciumspiegel bei Kindern und Erwachsenen.

Im Vergleich zu diesen Werten aus der Literatur liegen die Werte,die die Ultramikromethode ergab,im Durchschnitt niedriger.Sie zeigen aber doch eine weitgehende Übereinstimmung mit den Angaben in den neuesten Lehrbüchern der Kinderheilkunde (Keller-Wiskott,Fanconi-Wallgren).Auch gegenüber den Normwerten für Erwachsene liegen unsere Werte im Durchschnitt niedriger,obwohl nach den angeführten Untersuchungen von Siwe (48),nach den Angaben von Brock (8) und Leicher (25) der Calciumspiegel im Serum mit dem Alter absinkt.Da diese Untersuchungen in den Monaten Februar bis April durchgeführt wurden,besteht die Möglichkeit,daß sich der jahreszeitlich bedingte Tiefpunkt des Blutcalciumspiegels in den Ergebnissen niedergeschlagen hat.Diese Frage könnte durch Untersuchungen im Herbst oder Frühwinter,der Zeit des erwarteten Maximums geklärt werden.

Systematische Unterschiede zwischen einzelnen Alterstufen fanden sich bei unseren Untersuchungen nicht.

Tabelle 13

Autor, Jahr der Veröffentlichung	Alter der Probanten	Mittelwert mval/l	Bereich mval/l
Snively, Sweeney(5o) 1958	Erwachsene	5,o	4,5 - 5,8
Gamble(16) 1954	"	5,o	
Jeanneret(18) 1954	"	5,o	4,7 - 5,2
Lickint(27) 193o	"		4,5 - 5,5
Keller, Wiskott(21) 1961	Kinder		4,5 - 5,5
Fanconi, Wallgren(14) 1961	"		4,75 - 5,5
Nelson(33) 1959	"		5,o - 6,o
Todd, Chuinard, Wood(54) 1938	Neugeborene	5,o7	3,6 - 6,9
832 Fälle, zitiert bei Todd u.a.(54) 1938	"	5,49	4,35 -7,2o
Hellmuth(17) 1925	"		6,o - 6,6
Leicher(25) 1922	1. - 2o. Lebensjahr	5,8	5,6 - 6,o

Serumcalciumwerte: Angaben aus der Literatur.

Wegen des geringen Aufwandes an Serum und an zusätzlicher Arbeit können fast immer 2- oder 3-fach Bestimmungen durchgeführt werden. Unter den oben genannten Bedingungen weist die Calciumtitration nach M.C.Sanz eine Genauigkeit auf, die klinischen Bedürfnissen gut genügt. Die Übereinstimmung der gewonnenen Werte mit dem Nennwert von Testlösungen und den Ergebnissen anderer Methoden ist gut.

II. Chloride

1)Methode

Eine noch heute in vielen Modifikationen gebräuchliche Methode zur Titration von Chloriden wurde von J.Volhard in den Jahren 1874-78 entwickelt (56,57).Sein Prinzip,die Titration von Cl^- mit $AgNO_3$,wurde auch für Mikro- und Ultramikromethoden angewandt.King und Wootton (22) erfaßten bei ihrer Mikromethode (Probemenge o,2 ml) den Umschlagspunkt potentiometrisch.Ähnlich geht P.Kirk (23) bei seiner quantitativen Ultramikroanalyse vor;er bestimmt Chlormengen von o,5 - 3o γ .Die Titration von Cl^- ist aber nicht nur mit Silber,sondern auch mit Quecksilberionen möglich.1853 veröffentlichte J.v.Liebig (28) eine Methode zur merkurimetrischen Chloridbestimmung,wobei er Harnstoff als Indikator benützte.An Stelle des Harnstoffes führten Dubsky und Trtilek (11) das Diphenylcarbason als empfindlichen Indikator auf Hg^{++} ein.Der Vorteil der Quecksilbertitration besteht darin, daß $HgCl_2$ zwar undissoziiert,aber wasserlöslich ist,sodaß kein Fehler durch Niederschlag auftreten kann.

Auf dieser Grundlage entwickelten O.und S.Schales (42) eine Methode zur direkten Titration der Chloride,die mehrfach,auch von M.C.Sanz,für den Mikro- und Ultramikrobereich abgewandelt wurde.Sobel und Hanok (51) fanden für ihre Mikromethode (Probemenge o,2 ml) einen mittleren Fehler von $\pm$ o,92 % und für ihre Ultramikromethode (Probemenge 2,5 μl) einen mittleren Fehler von $\pm$ 1,74 %.

Die Methode von M.C.Sanz für die Ultramikroanalyse beruht auf dem gleichen Prinzip wie bei der Titration des Calciums mit Blindwert,Standard und Probe.Probemenge für eine Titration: 1o μl.Die Reaktion erfolgt in saurem Milieu.

Ansatz:

Blindwert	1o µl aqua dest.			
Standard	1o µl Standard-Lösung = 1oo mVal Cl/l	+ 8o µl	o,o3n Salpetersäure	+ 8o µl Indikator
Probe	1o µl Probe = Serum			

Der Ansatz wird mit einer o,1n Lösung von $Hg(NO_3)_2$ titriert, bis der Indikator von Orange nach Blaßviolett umschlägt. Der Chloridgehalt der Probe errechnet sich nach der Formel:

$$\frac{\text{Probe} - \text{Blindwert}}{\text{Standard} - \text{Blindwert}} \cdot 1oo = \text{mVal Cl/l}$$

Es wurde auf Cl^--freie Reagenzien geachtet, so daß der regelmäßig kontrollierte Blindwert stets Null ergab.

2)Versuche:

a)Fehlerbreite über einen Meßbereich von 25 - 2oo mVal Cl/l:

Es wurden 3 Reihen von je 5 1o-fach Bestimmungen ausgeführt. Titriert wurden geeichte wäßrige Lösungen von getrocknetem NaCl mit einem Chloridgehalt von 25 , 5o , 1oo , 15o , 2oo mVal Cl/l. Die 1oo mVal - Lösung lieferte den Standardwert. In Tabelle 14 sind die Titrationsergebnisse in Skalenteilen aufgeführt. Die Berechnung der Mittelwerte M, der mittleren quadratischen Abweichung, des Variationskoeffizienten und der Fehlerstreuung s erfolgte wie beim Calcium (s.S.). Die erhaltenen Werte zeigt Tabelle 15.

Der absolute Fehler in Skalenteilen nimmt mit steigender Verbrauchsmenge an Titrationslösung langsam zu, während der relative Fehler in % der verbrauchten Menge stetig abnimmt und im Bereich physiologischer Werte um 1oo mVal Cl/l bei 1,1% liegt. Das Verhältnis der gefundenen Werte zum Sollwert geht aus Tabelle 16 hervor; Berechnung und Anordnung entsprechen den Versuchen mit Calcium (s. S.). Die mittlere Abweichung liegt im Durchschnitt bei o,5%, der höchste Einzelwert beträgt 1,1%; die Abweichungen streuen nach beiden Richtungen. Die maximale Abweichung überschreitet 5% nur bei der niedrigsten verwendeten Konzentration von 25 mVal Cl/l.

Tabelle 14

Reihe I

Nennwert mval/l	Meßwerte in Skalenteilen									
25	13o	13o	135	12o	13o	12o	13o	125	12o	125
5o	25o	255	25o	245	255	245	26o	255	25o	255
1oo	5oo	495	495	5oo	515	495	5oo	5oo	5o5	5oo
15o	75o	74o	755	755	76o	755	745	75o	755	76o
2oo	995	1ooo	1o1o	1oo5	1ooo	995	1o1o	1o2o	1o1o	1o15

Reihe II

25	13o	125	125	13o	12o	125	12o	13o	125	125
5o	25o	245	255	25o	255	26o	25o	255	255	255
1oo	495	5oo	495	5o5	5oo	5o5	51o	5oo	5o5	5oo
15o	76o	76o	765	75o	755	75o	755	745	765	745
2oo	1o1o	99o	1oo5	1oo5	995	99o	1o1o	1oo5	1oo5	1ooo

Reihe III

25	115	125	13o	125	125	13o	12o	125	125	12o
5o	25o	26o	245	25o	255	25o	25o	255	25o	25o
1oo	49o	5oo	495	5o5	5o5	495	5oo	5o5	5oo	51o
15o	765	76o	74o	745	755	755	76o	755	76o	75o
2oo	1oo5	1ooo	1oo5	995	99o	1o1o	1o2o	99o	1ooo	1oo5

Reihentitration geeichter Chloridlösungen von 25,5o,1oo(=Standard),15o und 2oo mval Cl/l.

Tabelle 15

Reihe	Lösung mval/l	M	$n\sigma^2$	σ	s	Var.Koeff.
		in Skalenteilen				
I	25	126,5	252,5	5,o		
II	25	125,5	122,5	3,5	4,6	3,7 %
III	25	124,o	19o,o	4,4		
I	5o	252,o	21o,o	4,6		
II	5o	253,o	16o,o	4,o	4,4	1,8 %
III	5o	251,5	152,5	3,9		
I	1oo	5oo,5	322,5	5,7		
II	1oo	5o1,5	2o2,5	4,5	5,6	1,1 %
III	1oo	5oo,5	322,5	5,7		
I	15o	752,5	362,5	6,o		
II	15o	755,o	5oo,o	7,1	7,2	1,o %
III	15o	754,5	522,5	7,2		
I	2oo	1oo6,o	64o,o	8,o		
II	2oo	1oo1,5	5o2,5	7,2	8,4	o,8 %
III	2oo	1oo2,o	76o,o	8,7		

Mittelwerte und Fehlerberechnung aus den Meßwerten der Tabelle 14.

Tabelle 16

Sollwert mval/l	Mittelwert mval/l	Extremwerte mval/l	mittlere Abweichung in mval/l	in %	maximale Abweichung in mval/l	in %
25	25,27	26,97	+ o,27	=+1,1%	+ 1,97	=+7,9%
		23,98			- 1,o2	=-4,1%
	25,o2	25,92	+ o,o2	=+o,1%	+ o,92	=+3,7%
		23,93			- 1,o7	=-4,3%
	24,78	25,97	- o,22	=-o,9%	+ o,97	=+3,9%
		22,98			- 2,o2	=-8,1%
5o	5o,35	51,95	+ o,35	=+o,7%	+ 1,95	=+3,9%
		48,95			- 2,o5	=-4,1%
	5o,45	51,84	+ o,45	=+o,9%	+ 1,84	=+3,7%
		48,85			- 1,15	=-2,3%
	5o,25	51,95	+ o,25	=+o,5%	+ 1,95	=+3,9%
		48,95			- 1,o5	=-2,1%
1oo	1oo,o	1o2,9	Standard		+ 2,9	=+2,9%
		98,9			- 1,1	=-1,1%
	1oo,o	1o1,7	Standard		+ 1,7	=+1,7%
		98,7			- 1,3	=-1,3%
	1oo,o	1o1,9	Standard		+ 1,9	=+1,9%
		97,9			- 2,1	=-2,1%
15o	15o,3	151,8	+ o,3	=+o,2%	+ 1,8	=+1,2%
		147,9			- 2,1	=-1,4%
	15o,5	152,5	+ o,5	=+o,3%	+ 2,5	=+1,7%
		148,6			- 1,4	=-o,9%
	15o,7	152,8	+ o,7	=+o,5%	+ 2,8	=+1,9%
		147,9			- 2,1	=-2,1%
2oo	2o1,o	2o3,8	+ 1,o	=+o,5%	+ 3,8	=+1,9%
		197,8			- 2,2	=-1,1%
	199,7	2o1,4	- o,3	=-o,2%	+ 1,4	=+o,7%
		197,4			- 2,6	=-1,3%
	2oo,2	2o3,8	+ o,2	=+o,1%	+ 3,8	=+1,9%
		197,8			- 2,2	=-1,1%

Reihentitration geeichter Chloridlösungen: Abweichungen der Mittel- und Extremwerte vom Sollwert.

b)Reihentitration von „Labtrol":

Die Versuchsordnung ist die gleiche wie beim Calcium (s.S.). Nennwert des Labtrols = 11o,5 mVal Cl/l.Die Versuchsergebnisse sind wieder in tabellarischer Form zusammengestellt,und zwar:

Tab.17 : Einzelmessungen in Skalenteilen

Tab.18 : Fehlerberechnung

Tab.19 : Einzelwerte,Mittelwerte und Fehlerberechnung für Labtrol in mVal Cl/l.Die Berechnung erfolgte nach der Formel Seite 35 ,als Standard wurde $M_{Standard}$ der betreffenden Reihe gesetzt;der Blindwert betrug ausnahmslos Null.

Tab.2o : Vergleich der erhaltenen Mittel- und Extremwerte mit dem Nennwert.

Die Fehlerstreuung für Labtrol entspricht derjenigen,die für wässrige Lösungen ermittelt wurde: $s = \pm 5{,}67$ Skalenteile,bzw. $s = \pm 1{,}13$ mVal Cl/l entsprechend 1%.Die mittlere Abweichung vom Nennwert beträgt im Durchschnitt - o,4% mit einem höchsten Wert von - 1%.Die größte Abweichung eines Extremwertes liegt bei - 2,6%.

c)Vergleich von Ultramikromethode und Makromethode, von Kapillar- und Venenblut.

Die dritte Versuchsreihe zum Vergleich der Ultramikromethode mit einer laborüblichen Makromethode und zum Vergleich Kapillarblut/ Venenblut entspricht der Versuchsanordnung beim Calcium (s.S.). Als Vergleichsmethode wurde eine Modifikation der Volhard'schen Silbertitration angewandt,wie sie H.Marx (3o) angegeben hat;dabei werden $1cm^3$ Serum,$9cm^3$ aqua dest. und $1ocm^3$ n/58,5 $AgNO_3$,dem Salpetersäure und Eisenalaun zugesetzt ist,in einem Erlenmeierkolben zum Sieden erhitzt.Das Chlor fällt quantitativ als Chlorsilber aus. Das unverbrauchte Silbernitrat wird mit n/58,5 Ammoniumrhodanidlösung zurücktitriert.Die der unverbrauchten Rhodanidlösung entsprechende Chlormenge wird einer Eichkurve entnommen.

Tabelle 17

Standard

Reihe	Meßwerte in Skalenteilen									
I	500	500	495	490	500	490	485	490	490	495
II	505	495	500	500	500	500	495	500	500	505
III	495	495	500	505	505	495	505	505	490	505
IV	510	500	505	495	500	500	510	505	490	500
V	495	490	500	495	500	505	510	500	495	505

Labtrol

I	545	540	540	545	545	545	550	550	545	550
II	545	555	540	560	550	550	555	545	545	550
III	560	545	550	555	560	540	545	555	550	560
IV	550	555	545	540	545	550	550	545	550	555
V	540	555	545	560	555	545	550	555	550	555

Reihentitration des Chloridgehaltes in Labtrol:
Meßergebnisse in Skalenteilen.

Tabelle 18

Standard

Reihe	M in Skalenteilen	$n\sigma^2$	σ	Var.Koeff.	s in Skalent.
I	493,5	252,5	5,0	1,0%	
II	500,0	100,0	3,2	0,6%	
III	500,0	275,0	5,2	1,0%	5,38
IV	501,5	352,5	5,9	1,2%	
V	499,5	322,5	5,7	1,1%	

Labtrol

I	545,5	122,5	3,5	0,7%	
II	549,5	322,5	5,7	1,0%	
III	552,0	460,0	6,8	1,2%	5,67
IV	548,5	202,5	4,5	0,9%	
V	551,0	340,0	5,8	1,1%	

Reihentitration der Chloride in Labtrol:Mittelwerte und Fehlerberechnung der Meßergebnisse aus Tab.17.

Tabelle 19

Labtrol

Reihe	Einzelwerte in mval/l	M	$n\sigma^2$	σ	s
I	11o,4 1o9,4 1o9,4 11o,4 11o,4 11o,4 111,4 111,4 11o,4 111,4	11o,5	4,9	o,7	
II	1o9,o 111,o 1o8,o 112,o 11o,o 11o,o 111,o 1o9,o 1o9,o 11o,o	1o9,9	12,9	1,1	
III	112,o 1o9,o 11o,o 111,o 112,o 1o8,o 1o9,o 111,o 11o,o 112,o	11o,4	18,4	1,4	1,13
IV	1o9,7 11o,7 1o8,7 1o7,6 1o8,7 1o9,7 1o9,7 1o8,7 1o9,7 11o,7	1o9,4	8,1	o,9	
V	1o8,1 111,1 1o9,1 112,1 111,1 1o9,1 11o,1 111,1 11o,1 111,1	11o,3	13,6	1,2	

Reihentitration von Labtrol:Ergebnisse und Fehlerberechnung in mval Cl / l.

Tabelle 2o

Reihe	Mittelwert in mval/l	Extremwerte in mval/l	mittlere Abweichung in mval/l	in %	maximale Abweichung in mval/l	in %
I	11o,5	111,4 1o9,4	o	= o %	+ o,9 - 1,1	=+o,8% =-1,o%
II	1o9,9	112,o 1o8,o	- o,6	=-o,5%	+ 1,5 - 2,5	=+1,4% =-2,3%
III	11o,4	112,o 1o8,o	- o,1	=-o,1%	+ 1,5 - 2,5	=+1,4% =-2,3%
IV	1o9,4	11o,7 1o7,6	- 1,1	=-1,o%	+ o,2 - 2,9	=+o,2% =-2,6%
V	11o,3	112,1 1o8,1	- o,2	-o,2%	+ 1,6 - 2,4	=+1,5% =-2,2%

Reihentitration von Labtrol:mittlere und maximale Abweichungen der Meßwerte vom Nennwert des Labtrol(11o,5 mval Cl / l).

Tabelle 21

	Meßwerte in mVal/l		M in mVal/l
I/1	1o2,6o	1o2,6o	1o2,6o
II/1	1oo,89	1oo,89	1oo,89
III/1	1o5,3o	1o4,3o	1o4,8o
IV/1	1o4,31	1o4,31	1o4,31
V/1	1o2,6o	1o2,6o	1o2,6o
VI/1	1o7,73	1o7,73	1o7,73
VII/1	1o5,3o	1o5,3o	1o5,3o
VIII/1	1o2,6o	1o4,31	1o3,45
IX/1	1o4,31	1o4,31	1o4,31
X/1	99,18	99,18	99,18

Chloridtitration nach der Makromethode in zehn Serumproben.

Von dieser Makromethode wurden nur Doppelbestimmungen durchgeführt und auf die Fehlerberechnung verzichtet. Bei der rautinemäßigen Anwendung im Labor der Kinderpoliklinik zeigte diese Methode eine sehr gute Reproduzierbarkeit, wie ja auch bei den hier durchgeführten 1o Doppelbestimmungen acht keinen Unterschied aufwiesen.
Die Meßwerte der Makromethode sind in Tabelle 21 aufgeführt.
Die Titrationsergebnisse der Ultramikromethode sind in mVal Cl/l umgerechnet, wobei als Standard der Mittelwert von 2o Einzelbestimmungen gesetzt wurde:

$M_{Standard}$ = 5oo,5 Skalenteile
= ± 4,8 Skalenteile
Var.Koeff.= ± o,9 %

Die Einzelmessungen, die Mittelwerte und die Fehlerberechnung in mVal/l sind in Tabelle 22 enthalten. Dabei bedeuten:
I, II ..... X = Versuchspersonen
2 = Venenblut nach der Ultramikromethode
3 = Kapillarblut nach der Ultramikromethode
Die Fehlerstreuung beträgt bei der Ultramikromethode s = ± o,82 mVal/l das entspricht einem Variationskoeffizienten von ca. o,8 %.

Tabelle 22

	Einzelwerte in mval/l	M	$n\sigma^2$ in mval/l	σ	s
I/2	1o1,2 1o2,2 1o3,2 1o3,2 1o1,2	1o2,2	4,oo	o,89	
I/3	1o3,1 1o4,o 1o3,1 1o3,1 1o4,o 1o4,o	1o3,6	1,23	o,45	
II/2	1o2,2 1oo,2 1o1,o 1o2,2	1o1,4	2,88	o,85	
II/3	1o4,1 1o4,1 1o5,2 1o4,1 1o5,2 1o5,2 1o4,1	1o4,6	2,o8	o,55	
III/2	1o4,9 1o5,1 1o4,9 1o4,9	1o5,o	o,o4	o,1o	
III/3	1o7,o 1o7,9 1o7,o 1o7,o	1o7,2	o,61	o,39	
IV/2	1o4,o 1o5,o 1o5,o 1o6,o	1o5,o	2,oo	o,71	
IV/3	11o,1 1o8,2 1o7,2 1o7,2 1o9,2 11o,1 1o8,2 1o9,2	1o8,7	9,42	1,o9	
V/2	1o3,o 1o3,o 1o4,o 1o4,o 1o3,o	1o3,4	1,2o	o,49	o,82
V/3	1o6,2 1o6,2 1o4,1 1o6,2 1o5,o 1o5,o 1o4,1 1o6,2 1o6,2 1o5,o	1o5,4	7,o6	o,84	
VI/2	1o8,o 1o7,o 1o8,o 1o7,o 1o7,o	1o7,4	1,2o	o,49	
VI/3	1o7,2 1o7,2 1o8,1 1o8,1	1o7,7	o,82	o,45	
VII/2	1o5,o 1o4,o 1o5,o 1o5,o 1o5,o	1o4,8	o,8o	o,4o	
VII/3	1o4,1 1o6,1 1o5,o 1o6,1 1o6,1	1o5,5	3,29	o,81	
VIII/2	1o3,9 1o3,o 1o3,9 1o4,9 1o4,9	1o4,1	2,57	o,72	
VIII/3	1o6,9 1o5,8 1o5,8 1o6,9 1o8,8	1o6,8	2,o3	o,64	
IX/2	1o4,o 1o5,o 1o4,o 1o5,o 1o6,o	1o4,8	2,8o	o,75	
IX/3	1o6,9 1o6,9 1o6,o 1o6,9 1o6,9	1o6,7	o,65	o,36	
X/2	1o1,o 1o1,o 1o2,1 1o1,o 1o1,o	1o1,2	o,97	o,44	
X/3	1o5,o 1o5,o 1o2,1 1o5,o 1o4,o 1o5,o	1o4,4	6,89	1,o7	

Ultramikrotitration der Chloride im Venenblut(2) und im Kapillarblut(3) von zehn Probanten(I - X).

Tabelle 23

	M_1	M_2	M_3	$M_2 - M_1$	$M_3 - M_2$	Signifikanz $M_3 - M_2$	Signifikanz-grenze
	mval/l			mval/l	mval/l		
I	1o2,6o	1o2,2	1o3,6	-o,4	+1,4	3,o	3,9
II	1oo,89	1o1,4	1o4,6	+o,51	+3,2	<u>6,9</u>	3,9
III	1o4,8o	1o5,o	1o7,2	+o,2	+2,2	<u>9,5</u>	4,3
IV	1o4,31	1o5,o	1o8,7	+o,69	+3,7	<u>5,6</u>	3,8
V	1o2,6o	1o3,4	1o5,4	+o,8o	+2,o	<u>4,6</u>	3,6
VI	1o7,73	1o7,4	1o7,7	-o,33	+o,3	o,8	4,1
VII	1o5,3o	1o4,8	1o5,5	-o,5	+o,7	1,5	4,o
VIII	1o3,45	1o4,1	1o6,8	+o,65	+2,7	<u>5,6</u>	4,o
IX	1o4,31	1o4,8	1o6,7	+o,49	+1,9	<u>4,6</u>	4,o
X	99,18	1o1,2	1o4,4	+2,o2	+3,2	<u>5,6</u>	3,9

Vergleich der Chloridwerte im Venenblut nach der Makromethode(M_1) und der Ultramikromethode(M_2),und zwischen Venenblut(M_2)und Kapillarblut(M_3)nach der Ultramikromethode bei zehn Probanden. Für die Differenz $M_3 - M_2$ ist die Signifikanz berechnet. Die signifikanten Werte sind unterstrichen.

Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der drei verschiedenen Bestimmungen sind in Tabelle 23 berechnet.Die Chlorwerte des Venenblutes nach der Makromethode einerseits und der Ultramikromethode andererseits ($M_2 - M_1$) zeigen Abweichungen nach beiden Richtungen bis maximal 2,o2 mVal Cl/l = 2,o%.Die durchschnittliche Abweichung beträgt o,7%.Systematische Unterschiede zwischen Makro- und Ultramikromethode bestehen nicht.

Beim Vergleich der Werte,die man mit der Ultramikromethode von Venen- und Kapillarblut erhält ($M_3 - M_2$),fällt auf,daß der Chlorgehalt des Kapillarblutes in allen Fällen über dem des Venenblutes liegt,und daß dabei auch beträchtliche Abweichungen auftreten.Um einen systematischen Unterschied erfassen zu können,wurden die einzelnen Parallelversuche mittels der t-Funktion nach Student (zitiert nach **Gebelein und Heite** (15)) untersucht:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_2} + \frac{\sigma_2^2}{n_1}}} \cdot \sqrt{\frac{N - 2}{N}}$$

$N = n_1 + n_2$; $t = 3 + \frac{1o}{N}$ ist signifikant.

Tabelle 24

		Alter J	M	T	Einzelwerte in mval/l	M in mval/l	ns^2
I	1			8	1o4,4 1o4,4 1o6,2	1o5,o	2,16
	2			9	112,8 11o,5 1o9,8	111,o	4,93
	3			9	1o9,o 1o8,o 1o7,o	1o8,o	2,oo
	4			1o	1o8,6 1o9,5 1o3,o	1o7,o	24,18
	5			12	11o,8 11o,8 111,9 1o6,3	11o,o	18,58
	6			17	1o5,5 1o5,5 1o7,3	1o6,1	2,16
	7		1		113,o 113,o 113,7 112,o	112,9	1,47
	8		1		1o1,o 1o3,o 1o2,o	1o2,o	2,oo
II	9		1	1	1o8,o 1o8,o 1o8,7 1o9,8	1o8,6	2,17
	1o		1	3	111,6 11o,6 11o,6	11o,9	o,67
	11		1	7	1o6,2 1o7,2 1o7,2 1o7,2 1o7,2	1o7,o	o,8o
	12		1	14	11o,4 1o9,5 1o9,5 1o7,3	1o9,2	5,23
	13		1	14	1o5,4 1o5,4 1o4,6	1o5,1	o,43
	14		1	16	1o5,6 1o5,6 1o4,5 1o4,5 1o3,5	1o4,7	3,14
	15		1	2o	1o8,1 1o8,1 1o7,o 1o6,2	1o7,4	2,58
	16		1	23	1o5,5 1o5,5 1o4,5	1o5,1	o,68
III	17		2	2	1o3,o 1o3,o 1o4,o	1o3,3	o,67
	18		2	2o	1o6,o 1o6,o	1o6,o	o
	19		2	4	1o7,o 1o7,o 1o7,o 1o7,o 1o8,o	1o7,2	o,8o
	2o		2	7	1o7,o 1o6,o 1o7,o	1o6,7	o,67
	21		2	1o	1o6,o 1o6,o 1o8,o	1o6,7	2,67
	22		2	14	1o5,o 1o5,o 1o5,o 1o5,o 1o6,o	1o5,2	o,8o
	23		2	15	1o6,o 1o6,o 1o6,o 1o7,o 1o7,o 1o7,o	1o6,5	1,5o
	24		2	16	1o6,6 1o6,6 1o5,2 1o5,2 1o5,2	1o5,8	2,36
IV	25		3	4	113,2 11o,o 11o,o	111,1	6,83
	26		3	9	1o6,o 1o7,o 1o6,o	1o6,3	o,67
	27		3	25	11o,o 11o,o 1o9,o 11o,o 111,o	11o,o	2,oo
	28		3	26	1o9,9 1o9,9 1o9,9 11o,8	11o,1	o,61
	29		3	27	1o9,o 111,o 1o9,o 1o7,o 1o9,o	1o9,o	8,oo
	3o		4	1o	1o7,o 1o7,o 1o7,o 1o8,o 1o8,o 1o6,o	1o7,2	2,84
	31		5	18	1o3,o 1o4,o 1o5,o	1o4,o	2,oo
	32		5	21	1o5,2 1o7,2 1o8,2 1o8,2 1o6,3	1o7,o	6,65

Tabelle 24

Fortsetzung

	Alter J	M	T	Einzelwerte in mval/l	M in mval/l	$n\sigma^2$
	33	7	26	113,1 113,1 114,1 112,1	113,1	2,00
	34	1o	21	1o5,5 1o4,5 1o3,7	1o4,6	1,63
	35	11	7	112,1 112,1 1o9,1	111,1	6,00
	36	11	14	1o7,9 1o7,9 11o,o 112,o	1o9,5	11,62
V	37	1	5	1o9,o 1o8,o 1o7,o	1o8,o	2,00
	38	1 3	2	1o9,4 1o8,5 1o8,5	1o8,8	o,54
	39	2 1	15	115,o 113,o	114,o	2,00
	4o	2 3		1o8,8 1o8,8 111,o	1o9,5	3,23
	41	2 9		1o5,2 1o5,2 1o6,3	1o5,6	o,81
	42	2 9		1o9,o 1o8,o 1o6,o	1o7,7	4,67
	43	3		116,o 115,1 115,1 113,1	114,8	4,51
	44	3		1o5,o 1o5,o 1o6,o	1o5,3	o,67
VI	45	3 1		1o3,9 1o4,9 1o4,9 1o3,o	1o4,2	2,51
	46	3 1	12	11o,7 1o7,o	1o8,8	6,85
	47	3 2		1o6,1 1o9,1 11o,o	1o8,4	8,34
	48	4 8		1o5,3 1o4,5	1o4,9	o,32
	49	5		1o7,o 1o7,o 1o6,o 1o5,o 1o6,o 1o5,o 1o6,o 1o7,o 1o7,o	1o6,2	5,56
	5o	5 1o		11o,o 111,o 111,o 112,o	111,o	2,00
	51	5 1o		1oo,o 1o1,o 1o1,o 1oo,5	1oo,6	o,69
VII	52	6 5		111,o 1o9,7 1o8,8	1o9,8	2,45
	53	6 6		1o3,o 1o3,o 1o4,o 1o4,o	1o3,5	1,oo
	54	6 1o		1o7,o 1o7,o 1o8,8 1o8,8	1o7,9	3,24
	55	7		1o2,o 1o2,o 1o1,o	1o1,7	o,67
	56	7 3		11o,o 11o,o 1o8,o	1o9,3	2,67
	57	7 9		1o1,o 1oo,o 1oo,5	1oo,5	o,5o
	58	12		11o,o 1o8,o 1o6,o	1o8,o	8,oo
	59	12 2		1o5,o 1o4,o 1o4,o	1o4,3	o,67
	6o	12 2		11o,o 11o,o 11o,o 1o8,o 1o9,o 112,o 11o,o	1o9,9	8,87
	61	12 5		111,2 112,1 11o,o	111,1	2,22
	62	15 3		112,6 1o9,8 1o8,7	11o,4	8,o9
	63	16		1o6,4 1o7,4 1o6,4 1o8,3	1o7,1	2,51

Serumchloridwerte von 63 Kindern in 7 Altersgruppen; Einzelwerte, Mittelwerte und methodischer Fehler s .

$\Sigma n\sigma^2 = 219,09$

$s = 1,13$

Die Signifikanzgrenze ergab sich nach der Formel $3 + \frac{10}{N}$.
Die Ergebnisse der Signifikanzberechnung sind ebenfalls in Tabelle 23 dargelegt.Die signifikanten Werte sind unterstrichen. Der Chlorgehalt des Kapillarblutes liegt in sieben der zehn untersuchten Fälle signifikant höher als der des venösen Blutes.Der Mittelwert der gefundenen Differenzen zwischen Kapillar- und Venenblut beträgt 2,1 mVal Cl/l.Um diesen Betrag liegt also der Chlorgehalt des Kapillarblutserums über dem des Venenblutserums.

d)Normalwerte bei Kindern:

Wie bei den Untersuchungen des Serum-Calciums wird auch die Versuchsreihe der Serumchloridbestimmung nach M.C.Sanz mit einer Normwertermittlung abgeschlossen.Es wurde das Kapillarblut von 63 Säuglingen und Kindern im Alter von 8 Tagen - 16 Jahren ohne klinische Zeichen für Elektrolytstörungen analysiert.Die Blutabnahme erfolgte wie bei der Calciumbestimmung (s.S.10).Zu jeder Probe wurden zwei Standard- und ein Blindwert titriert.Zur Berechnung der Ergebnisse wurde der Mittelwert der Standardtitrationen eines Arbeitsganges - wenigstens acht Werte - in die Formel Seite als Standard eingesetzt.Die Blindwerte ergaben stets Null.Die 126 Standardwerte streuten um den Mittelwert M = 501 Skalenteile,das entspricht einem Variationskoeffizienten von $\pm$ 1,0 %.

Tabelle 24 zeigt das Alter der Kinder,die Einzel- und Mittelwerte in mVal Cl/l und die Berechnung der Fehlerstreuung.Diese beträgt s = $\pm$ 1,13 mVal Cl/l entsprechend $\pm$ 1,0 % des gemeinsamen Mittelwertes.Gemeinsame Mittelwerte und mittlere quadratische Abweichungen wurden für alle Gruppen zusammen und für folgende Altersgruppen getrennt berechnet:(Tabelle 25)

I	:	1.Lebensmonat
II	:	2.Lebensmonat
III	:	3.Lebensmonat
IV	:	4. - 12.Lebensmonat
V	:	2. + 3.Lebensjahr
VI	:	4. - 6.Lebensjahr
VII	:	7. - 16.Lebensjahr

Tabelle 25

Mittelwerte und mittlere quadratische Abweichung

	der einzelnen Altersgruppen	aller Altersgruppen
I	1o7,8 ± 3,3 mval/l	1o7,5 ± 3,1 mval/l
II	1o7,3 ± 2,1 "	
III	1o5,9 ± 1,2 "	
IV	1o8,6 ± 3,8 "	
V	1o9,2 ± 3,3 "	
VI	1o6,3 ± 3,2 "	
VII	1o7,o ± 3,4 "	

Serumchloridwerte der Altersgruppen in Tab.24

Die Mittelwerte der einzelnen Altersgruppen liegen zwischen 1o5,9 und 1o9,2 mVal Cl/l.Systematische Unterschiede ergaben sich nicht. Der gemeinsame Mittelwert aller Bestimmungen kann daher als Normalwert für die Serumchloridbestimmung bei Kindern nach der Methode von M.C.Sanz betrachtet werden.Er beträgt 1o7,5 ± 3,1 mVal Cl/l. Etwas mehr als zwei Drittel der Einzelmessungen liegen in diesem Streubereich.Als Extremwerte nach oben und unten wurden 1oo,5 mVal Cl/l - 114,8 mVal Cl/l gefunden.

3)Auswertung der Versuche:

a)Reproduzierbarkeit:

Im Bereich physiologischer Serumchlorwerte liegt die Fehlerstreuung zwischen ±o,8% und ±1,o%.Die Titration des Standards weist einen ähnlichen Fehler auf.Deshalb ist auch hier wie bei der Calciumtitration eine Mehrfachbestimmung des Standards wie der Probe angezeigt,die wegen der geringen benötigten Probemengen und der leichten Durchführbarkeit fast immer möglich sind.Auf diese Weise erhält man Ergebnisse,deren Genauigkeit den klinischen Anforderungen gut entsprechen.

Im Verlaufe der Arbeit ersetzten die Apotheken der Klinischen Universitätsanstalten,München,alle Reagentien des Chempaks.Auch dabei trat keine Verunreinigung des Blindwertes durch Chlorionen ein.Auch der Mittelwert der Standardtitrationen blieb gleich.

b)Unterschied des Chlorgehaltes in Venen- und Kapillarblut:

Beim Vergleich des Chlorgehaltes im Venenblut und im Kapillarblut zeigte sich eine Abweichung des Kapillarblutes nach oben um durchschnittlich 2,1 $\pm$ o,98 mVal/l.Als Ursache dieser Differenz seien hier die Untersuchungen von van Slyke und Cullen (49) und von W. Schober (43) diskutiert.Der Chlorgehalt der Erythrozyten verhält sich zu dem des Serums wie 1:2.Bei Anreicherung des Blutes mit CO_2 oder bei experimenteller Säuerung sinkt die Löslichkeit von Cl^- im Serum;das Chlor tritt vermehrt in die Erythrozyten über.Daher sind die roten Blutkörperchen im venösen Blut chlorreicher als im arteriellen,während der Serumchlorspiegel ein umgekehrtes Verhalten zeigt.Der Unterschied in der CO_2-Beladung wird bei unserem Vorgehen noch dadurch verstärkt,daß das venöse Blut unter Bedingungen gewonnen wird,die nur eine geringe Berührung mit dem Sauerstoff der Atmosphäre gestatten;dagegen haben bei der Entnahme des Kapillarblutes die einzeln austretenden Tropfen eine verhältnismäßig große Berührungsfläche mit der Außenluft,so daß eine zusätzliche Abgabe von CO_2 erfolgen kann.Die verschiedene Austrittsgeschwindigkeit und Tropfengröße bedingen eine stärkere oder schwächere Diffusionsmöglichkeit für das CO_2,wodurch sich auch der große Spielraum der Abweichungen von + o,3% bis + 3,5% erklären läßt.

c)Spezifische Fehlerquellen:

Bei der merkurimetrischen Chloridbestimmung treten kaum Störungen auf,wenn man den Indikator rechtzeitig erneuert und ihn der Probe erst unmittelbar vor Titrationsbeginn zusetzt.Der Umschlagspunkt ist bei diffusem Tageslicht sehr deutlich zu erkennen und kann auch bei leicht hämolytischem Serum noch gut definiert werden.Nur bei UV-armen Kunstlicht wird der Umschlagspunkt undeutlich.Im Übrigen zeichnet sich die Methode durch Einfachheit und Sicherheit aus.

d)Zeit- und Arbeitsaufwand:

Da die Chloridbestimmung im Arbeitsgang der Calciumtitration gleicht,entsprechen sich der Aufwand an Zeit und Arbeit bei beiden Methoden (s.S.).

Tabelle 26

Autor, Jahr der Veröffentlichung	Alter der Probanten	Mittelwert mval/l	Bereich mval/l
Snively, Sweeney(5o) 1958	Erwachsene	1o3	98 - 1o6
Gamble(16) 1954	"	1o3	
Jeanneret(18) 1954	"	1o2,9	97,3 - 1o7,2
Lickint(27) 193o	"		93 - 1o4,4
Keller, Wiskott(21) 1961	Neugeborene & Frühgeborene		1o3 - 1o9
	Säuglinge und Kinder		98 - 1o6
Fanconi, Wallgren(14) 1961	Kinder		96 - 1o6
Nelson(33) 1959	Kinder		1oo - 1o6
	Neugeborene & junge Säugl.		" + 6 - 1o
Schober(zitiert nach Brock(8)) 1954	Kinder		98 - 1o7
Török, Neufeld(55) 1934	1-1o Monate		85 - 117

Serumchloridwerte: Angaben aus der Literatur.

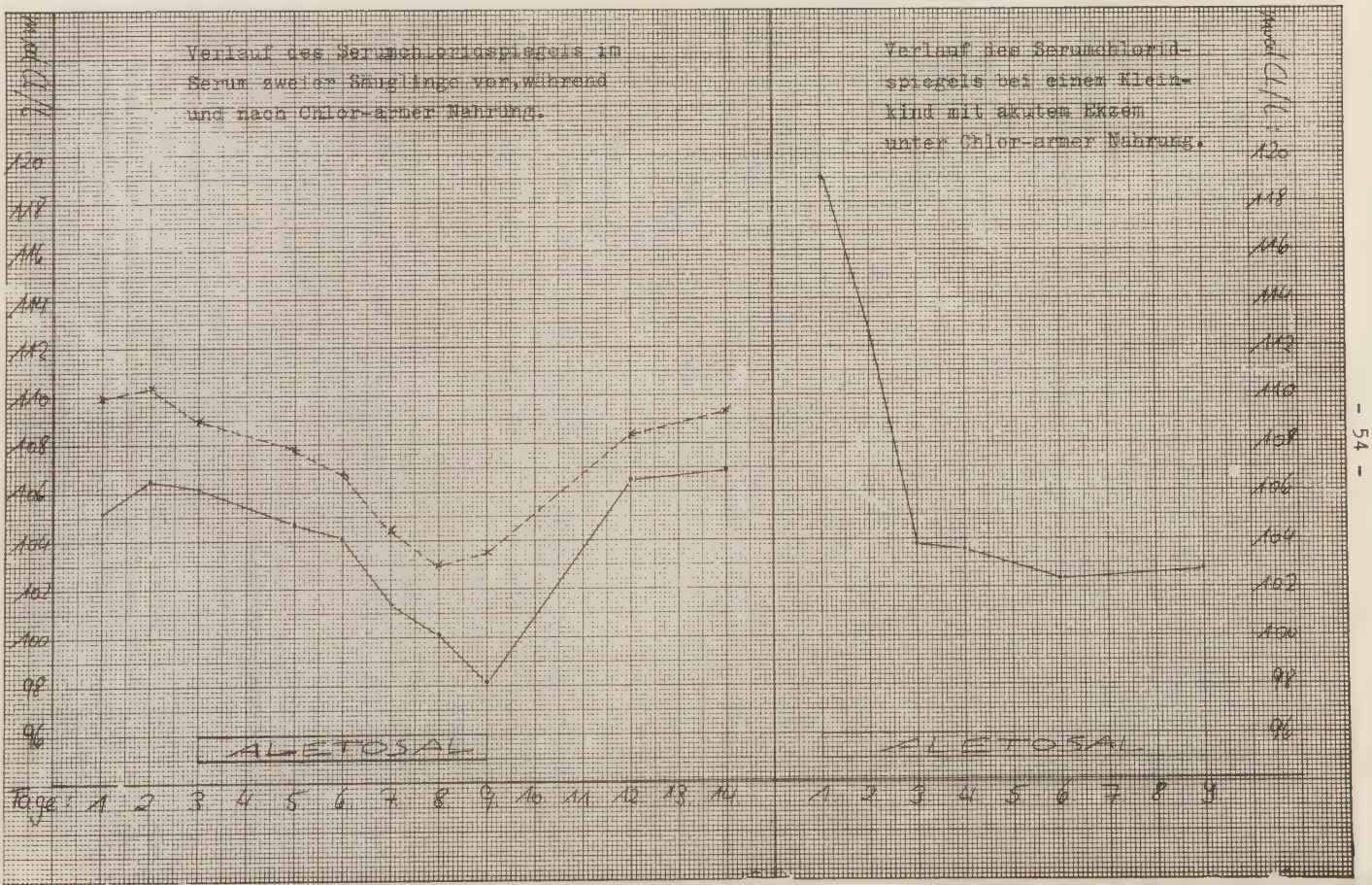
e) Normalwerte:

Nach der Ultramikromethode von Sanz ergaben sich folgende Normalwerte für den Serumchloridspiegel bei Kindern bis zu 16 Jahren:

Alter	Mittelwert	mittl.quadr.Abw.	Extremwerte
bis zu 16 Jhr.	1o7,5 mVal/l	± 3,1 mVal/l	1oo,5 - 114,8 mVal/l

Die Tabelle 26 zeigt einen Ausschnitt der Normalwerte, die in der Literatur für den Serumchloridspiegel sowohl bei Erwachsenen als bei Kindern beschrieben sind. Die hier aufgeführten Werte liegen fast durchweg unter denen, die bei unseren Untersuchungen gefunden wurden. Nur Török und Neufeld (55) beschreiben eine größere Variationsbreite und höhere Grenzwerte.
An dieser Differenz ist als ursächlicher Faktor sicher die systematische Abweichung beteiligt, die für den Chlorgehalt des Venen- und Kapillarblutes oben erörtert wurde. Zieht man die mittlere Differenz Kapillarblut/Venenblut (2,1 mVal/l) von dem gefundenen Normalwert 1o7,5 ab, so ergibt sich ein auf "Normalbedingungen" (= venöse CO_2 - Sättigung) reduzierter Wert von 1o5,4 ± 3,1 mVal Cl/l. Dieser Normbereich deckt sich schon weitgehend mit den zitierten Werten. Die in der Li-

Abb.5


Verlauf des Serumchloridspiegels im Serum zweier Säuglinge vor, während und nach Chlor-armer Nahrung.
ALETOSAL
Verlauf des Serumchloridspiegels bei einem Kleinkind mit akutem Ekzem unter Chlor-armer Nahrung.
ALETOSAL
Tage

teratur berichteten höheren Chlorwerte bei Neugeborenen und jungen Säuglingen fanden sich bei unseren Untersuchungen nicht;allerdings waren die Probanden schon 8 Tage alt.

4)Anwendungsmöglichkeiten:

Die Ultramikromethode eröffnet auf Grund ihrer Vorteile vielseitige Möglichkeiten für Untersuchungen,die mit den üblichen Methoden nur schwierig durchzuführen sind.So kann auch in kürzeren Zeitabständen Blut für Serienuntersuchungen bei Kindern und Säuglingen gewonnen werden,ohne den Patienten in unzumutbarer Weise zu belästigen.Einen Fortschritt in anderer Richtung bedeutet es,wenn Körperflüssigkeiten, die vom Säugling nur in geringen Mengen zu gewinnen sind,direkt analysiert werden können.Für beide Anwendungsmöglichkeiten soll im folgenden noch ein experimentelles Beispiel gebracht werden.

a)Serumchlorspiegel bei chlorfreier Ernährung:

In der Therapie der exsudativen Diathese wird eine kochsalzarme Ernährung angestrebt.Es sollte nun geprüft werden,ob die Ernährung mit kochsalzfreiem "Aletosal" eine Auswirkung auf den Chlorspiegel des Blutserums erreicht.Bei zwei Säuglingen im Alter von zwei und drei Monaten wurden drei Tage die Serumchlorwerte bestimmt;dann wurden die Probanden auf kochsalzfreie Nahrung umgesetzt und die Serumchloride sechs Tage weiterverfolgt und drei Tage nach Übergang auf Normalkost wieder kontrolliert.Den Verlauf der gewonnenen Werte zeigt die Abb.5 (linke Seite).Bei einem dritten Patienten im Alter von zwei Jahren, der mit einem hochgradigen disseminierten Ekzem in die Klinik eingewiesen und sofort mit kochsalzfreier Nahrung behandelt wurde,ist der Verlauf der Serumchlorwerte in Abb.5 (rechte Seite) aufgetragen. Die Fälle zeigen ein deutliches Ansprechen des Serumchlorspiegels auf die kochsalzfreie Ernährung und einen Wiederanstieg nach Übergang zu normaler Kost.Auffällig ist auch der hohe Ausgangswert und der rasche Abfall der Chlorwerte bei dem Ekzempatienten.Zur Frage des Chlorhaushaltes bei exsudativen Kindern berichtet H.Opitz (34),daß der Chlorgehalt des Serums häufig an der oberen Grenze der Norm liegt und einige erhebliche Überschreitungen der Norm vorkommen.Eine Kongruenz zwischen Serumchloridwerten und Krankheitsverlauf sei nicht nachzuweisen,der Mineralstoffwechsel bei exsudativen Kindern auffallend labil.

Ein Abfall des Chlorspiegels auf pathologische Werte erfolgte im Zeitraum der Untersuchungen nicht.Nach Brock (8) wird auch über eine längere Zeit eine chlorarme Kost - z.B.von herz- oder nierenkranken Kindern - erstaunlich gut vertragen;ein Unterangebot an Chlor kommt bei Säuglingen praktisch nicht vor.

b)Speichelchloride:

Die Bestimmung des Chlorgehaltes im Speichel wird immer dann angezeigt sein,wenn eine zystische Pankreasfibrose in den Bereich differentialdiagnostischer Erwägungen rückt.Bei der üblichen Labormethode wird der Speichel mit einem Tupfer im Mund des Säuglings aufgenommen,durch Wägung gemessen und mit reichlich destilliertem Wasser ausgewaschen.Alle diese Vorgänge sind mühsam und mit erheblichen Fehlerquellen belastet.Mit der Ultramikroapparatur ist eine direkte Bestimmung der Chloride im Speichel möglich.

Methode:

Auf den Konus einer Probepipette wird eine Polyäthylenkapillare von 1oo - 25o µl Volumen aufgesetzt,wie sie im Sparepak mitgeliefert werden.Mit dieser Pipette geht man in den Mund des Säuglings ein und saugt unter der Zunge und im Bereich der Parotismündung den Speichel auf;der so gewonnene Speichel wird in ein Zentrifugenröhrchen gebracht.Nach drei bis vier solchen Entnahmen genügt der gewonnene Speichel meist für eine Dreifachbestimmung.Die Entnahme erfolgt frühestens zwei Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme des Säuglings.Ist der Mund sehr trocken und zunächst kein Speichel zu gewinnen,so läßt man den Säugling ein wenig an der Pipette lutschen, worauf meist eine genügende Speichelsekretion in Gang kommt.
Der gewonnene Speichel wird zentrifugiert,so daß sich die festen Bestandteile absetzen.Diese bestehen mikroskopisch vorwiegend aus Zelldetritus und enthalten nur wenig Chloride.Der zentrifugierte Speichel läßt sich besser pipettieren.
Der Speichel erfordert wegen seiner hohen Viskosität beim Pipettieren ein etwas modifiziertes Vorgehen.Folgende Schwierigkeiten müssen dabei berücksichtigt werden:
Reinigung der Pipetten durch Überlaufenlassen eines Tropfens ist nicht möglich.Um für jeden Meßvorgang dieselben Bedingungen herzustellen,werden die Probepipetten jedesmal sorgfältig mit destilliertem Wasser gespült.Das Wasser läßt man von einem an die Pipettenspitze

gehaltenen Tupfer aufsaugen,da so die beste Leerung der Kapillare möglich ist.
Das blasenfreie Füllen erfordert besondere Vorsicht.Das Zentrifugenröhrchen wird mit einer Rasierklinge so abgeschnitten,daß der fast immer über dem Speichel angesammelte Schaum wegfällt.
Entleerung der Pipette:die gefüllte Probepipette wird in die Salpetersäure ausgeblasen,die man schon vorher in die Mikrotitrationsbecher pipettiert hat.Die Spitze der Probepipette wird in die Salpetersäure getaucht,ausgeblasen und am Boden des Bechers abgestreift; dann wird die Pipette durch zweimaliges vorsichtiges Aufsaugen von Salpetersäure gespült.Dabei darf nichts von der Probe durch Überlaufen verloren gehen.Die Pipette wird aus der Salpetersäure gezogen,sorgfältig ausgeblasen und sofort mit destilliertem Wasser ausgespült.
Bei stark viskösem Speichel setzen sich an der Auslaßspitze der Bürette Eiweißfäden fest,die den Farbumschlag stören.Dies verhindert man,indem man zuerst den seitwärts gedrehten Rührer in den Titrationsbecher eintaucht und dann erst die Bürettenspitze.Die Schleimfäden haben sich dann am Rührer angesammelt und stören die Titration nicht.Titration und Berechnung erfolgen wie bei der Bestimmung im Blutserum.

Reproduzierbarkeit,Normalwerte:

Nach der oben beschriebenen Methode wurden die Speichelchloride von 3o nicht an Mucoviscidose erkrankten Säuglingen im Alter von 21 Tagen bis 12 Monaten bestimmt.Die Ergebnisse der Einzelanalysen,die Mittelwerte und die Fehlerberechnung sind in Tabelle 27 aufgetragen. Die mittlere Fehlerstreuung wurde mit s = $\pm$ o,81 mVal/l errechnet; das sind ca.2% des Mittelwertes aller Bestimmungen.Als Normalwerte ergaben sich:

Mittelwert	mittlere quadrat. Abweichung	Extremwerte
42,2 mVal/l	$\pm$ 24,o mVal/l	15,o - 74,7 mVal/l

Besprechung:

Die Reproduzierbarkeit der Methode entspricht den Ergebnissen bei der Serumanalyse.Sie ermöglicht eine rasche und einfache Analyse der Speichelchloride auch bei jungen Säuglingen.

Tabelle 27

	Alter M	Alter Tg	Einzelwerte in mval/l	M mval/l	$n\sigma^2$ mval/l	s mval/l
1		21	62,o 61,2	61,6	o,32	
2		22	38,o 38,6 37,6 38,2 39,2	38,3	1,49	
3	1		74,6 75,o 73,8 75,4	74,7	1,4o	
4	1	7	54,4 55,6 54,8	54,9	o,75	
5	1	12	64,8 63,6	64,2	o,72	
6	1	14	39,o 39,o 38,o	38,7	o,67	
7	2		4o,2 38,6 39,6 4o,6	39,8	2,28	
8	2		22,o 23,o 23,4 22,2	22,7	1,32	
9	2	14	37,2 36,8	37,o	o,o8	
1o	3	7	37,2 37,8 36,4 36,8	37,1	1,o8	
11	3	14	14,8 14,4 15,o 15,2 15,4	15,o	o,6o	
12	4		52,4 51,2 53,o 52,o	52,2	1,72	
13	4		28,o 29,o 29,4	28,8	1,o4	
14	4	14	4o,2 41,o 43,o 43,o	41,8	6,o8	
15	4	16	74,4 73,2	73,8	o,72	o,81
16	4	21	59,2 6o,4	59,8	o,72	
17	5		37,6 36,o 39,4	37,7	5,79	
18	5	14	15,6 16,4 16,8 16,6	16,4	o,84	
19	6		52,4 54,o 55,o	53,8	3,44	
2o	6	2	43,o 44,o 41,6 43,4	43,o	3,12	
21	7	7	31,o 3o,2 31,4	3o,9	1,15	
22	7	14	28,2 28,8 29,8	28,9	1,31	
23	8		49,o 5o,4	49,7	o,98	
24	8	21	41,o 42,8 42,2 42,o	42,o	1,68	
25	9		24,6 23,o 22,8 22,o	23,1	3,56	
26	9		42,o 42,6	42,3	o,18	
27	9	7	2o,2 2o,o 19,6	19,9	o,19	
28	9	1o	39,6 4o,2 4o,8	4o,2	o,72	
29	1o		37,6 37,8 38,4	37,9	o,35	
3o	12		59,o 58,2	58,6	o,32	

Speichelchloridwerte von 3o Kindern im Alter von 21 Tagen bis 12 Monaten:Einzelwerte,Mittelwerte und methodischer Fehler.

Tabelle 28

Autor, Jahr der Veröffentlichung	Speichel-gewinnung	Zahl,	Alter der Probanden	Speichelchloride in mval/l
Fanconi, Wallgren(14) 1961				4 - 6o
di Sant'Agnese(38) 1958	Stimuliert Sammeln		älter als 6 Jahre	16 ± 4,9
Dancis(9) 1957	Tupfer	33	1 Tg-1 Jahr, aus Diagramm entnommen	38,9 (16 - 72)
Johnson(19) 1956	Sonde am Duct.Stenon.		2 - 14 Jahre	22,1 (8,9-54,o)
Kaiser(2o) 1956	Tupfer	14	8 - 11 Tage	44,7
		16	11 Tg-11 Mon.	25,5
		9	älter als 1 J.	12,6
Anders(2) 1956	Sammeln	431	3J 6M - 15J 2M	16,25 ± 4,63 (6,49 - 42,87)
Hubbel, zitiert bei Anders(2) 1956		32	8J 9M - 16J 5M	12,6(8,78-17,o6)
Mc Grady(32) 1955	Tupfer	1oo	Kinder	6,8 - 22,o
White(58) 1955	Stimuliert Sammeln		Erwachsene	29,o ± 8,8
Mathis(31) 1934	Sammeln		Erwachsene	15,8

Literaturangaben zum Speichelchloridgehalt.

Vergleicht man die Werte aus der meist neueren Literatur über den Chlorgehalt des Speichels, die in Tabelle 28 zusammengestellt sind, so fällt die Verschiedenheit der Ergebnisse, vor allem der Streubereiche auf. Dies ist eine Folge der vielen, nicht standardisierten Versuchsbedingungen: Art der Speichelgewinnung, Stimulation, Zeit der Entnahme, Alter der Versuchsperson, analytisches Vorgehen. Diese und andere Faktoren üben einen Einfluß auf die Versuchsergebnisse aus und sollen im Folgenden kurz diskutiert werden.

Nach Untersuchungen von Thaysen (53) hängt die Chlorkonzentration des Speichels von der Sekretionsgeschwindigkeit ab. Er fand folgende Verhältnisse:

Sekretionsgeschwindigkeit in ml/min.	Chlorgehalt in mVal/l
o,31	1o
3,66	43

Der Chlorgehalt steigt demnach mit der Sekretionsgeschwindigkeit an. Dieser Umstand läßt erwarten, daß sich der Chlorgehalt auch ändert,

wenn die Speichelsekretion z.B. durch Kauen von Paraffin oder durch Gabe von Physostigmin stimuliert wird.Dieser Zusammenhang wurde von Prader (35) herausgearbeitet.Dagegen fand White (58) keine Abhängigkeit der Speichelzusammensetzung von der Stimulation; wichtig sei nur,durch konstantes Vorgehen jeweils reproduzierbare Versuchsbedingungen zu schaffen.

Von größter Wichtigkeit für die Beurteilung unserer Ergebnisse ist die Abhängigkeit der Speichelchloride vom Alter der Versuchsperson. Dancis (9) untersuchte die Speichelchloride von 13 reifen und 14 frühgeborenen Kindern im Alter von 1 Tag bis 8 Wochen.Am ersten Lebenstag fanden sich in 5 Fällen Werte von 59 - 72 mVal/l,Mittelwert 64 mVal/l;am 2.Lebenstag bei 3 Fällen ein Mittelwert von 45 mVal/l Die Werte von 19 Säuglingen im Alter von 1 - 8 Wochen liegen zwischen 2o und 4o mVal/l,Mittelwert 29 mVal/l.Der sehr hohe Chlorgehalt des Speichels zur Zeit der Geburt sinkt nach dem ersten Lebenstag sehr rasch ab;vom Beginn der ersten Lebenswoche ist der Konzentrationsabfall nur noch gering und dauert bis zum Ende des 2.Lebensjahres.Von da ab besteht keine Altersabhängigkeit mehr.Zu ähnlichen Ergebnissen gelangt Kaiser (2o).Hier wird eine Altersgrenze am Ende des ersten Lebensjahres gesetzt: Die jüngeren Kinder haben signifikant höhere Speichelchlorwerte als die älteren.

Eine weitere Versuchsbedingung von Einfluß ist die Zusammensetzung des gewonnenen Speichels aus den Sekreten verschiedener Drüsen.Mc Grady (32) hält nur die Analyse des Parotissekretes für differentialdiagnostisch verwertbar,da die Werte des gemischten Speichels zu große Schwankungen aufwiesen.
Aus diesen Gründen kann ein Vergleich der verschiedenen Werte aus der Literatur mit den Ergebnissen unserer Versuche nur mit Vorbehalt angestellt werden.Dabei zeigt sich aber doch eine annähernde Übereinstimmung mit den Werten jener Autoren,die die entsprechende Altersgruppe untersuchten (Kaiser (2o),Dancis (9),vergl.Tabelle 28).

Verwendung der Speichelchloride bei der Diagnose der Mucoviscidose:

In einem Übersichtsreferat schreibt Fanconi (13),man müsse immer an die Möglichkeit einer zystischen Pankreasfibrose denken,wenn bei einem sonst normalen Säugling ein dauernder Zustand schwerer Er-

schöpfung auftrete.Auch bei einer chronischen Bronchitis muß der Verdacht einer Mucoviscidose auftreten.Wegen der Häufigkeit dieser Zustände in der Kinderklinik und auch wegen des nicht zu seltenen Vorkommens der Mucoviscidose,beansprucht dieses Krankheitsbild ein beträchtliches differentialdiagnostisches Interesse.Die Mucoviscidose betrifft die mucinbildenden Zellen des Organismus und bewirkt eine spezifische Änderung des Elektrolytgehaltes des Schweißes und des Speichels.Di Sant'Agnese (37) fand bei 43 an Mucoviscidose erkrankten Kindern 4 - 5 mal höhere Na-und Cl-Werte im Schweiß als bei gesunden Vergleichskindern (1955).Dieselben Elektrolytverschiebungen finden sich im Speichel:Mc Grady (32) fand im Parotissekret von 5 Mucoviscidosepatienten 27,2 - 58,1 mVal Cl/l,bei 1oo normalen Vergleichskindern 6,8 - 22,o mVal Cl/l;Johnson (19) berichtet bei 31 kranken Kindern einen Mittelwert der Speichelchloride von 29,3 gegenüber 22,1 mVal/l bei gesunden Kindern.In der Versuchsreihe von 8 an Mucoviscidose erkrankten Kindern,über die Kaiser (2o) berichtet, findet sich ein Mittelwert von 29,9 mVal Cl/l im Speichel;dabei ein Säugling mit 87,1 mVal/l.Bei dieser Einzelbeobachtung an einem Säugling liegt der Wert ebenfalls über dem für die Altersgruppe normalen Wert.Neuere Untersuchungen von di Sant'Agnese (38) ergaben einen mittleren Speichelchlorgehalt bei Mucoviscidose von 24 $\pm$ 6,1 mVal/l gegenüber 16 $\pm$ 4,9 mVal/l bei Vergleichskindern.

Trotz dieser Unterschiede wird der Chlorgehalt des Speichels bisher zur Differentialdiagnose der Mucoviscidose kaum benützt.In einer Zusammenfassung der Laboratoriumsmethoden "Zur Diagnose der Pankreasfibrose" führt Schultze - Jena (45) keine Methode zur Chlorbestimmung im Speichel an.Dafür gibt es vor allem zwei Gründe: einmal ändert sich der Chlorgehalt des Speichels im Laufe der ersten zwei Lebensjahre;zweitens zeigen die Werte erkrankter und gesunder Kinder eine verhältnismäßig große Überschneidung,die von fast allen Autoren betont wird (Johnson (19),Kaiser (2o),di Sant'Agnese (36,38)).Dagegen sind die Elektrolytverhältnisse in Bezug auf Änderungen im Schweiß signifikant und die Normalwerte des Schweißes vom ersten Lebenstag an konstant (di Sant'Agnese (36,37),Kaiser (2o)).Als pathognomonische Merkmale stellt di Sant'Agnese (39) heraus:abnorme Schweißelektrolytwerte in 99%,Lungenbeteiligung in mehr als 99%,Pankreasdysfermentie in mehr als 8o% der untersuchten Fälle.Die exakte Dia-

gnose der Mucoviscidose wird sich daher stets auf die Analyse dieser Veränderungen stützen und die Speichelchlorwerte nur als Ergänzung werten.

Dagegen scheint es durchaus möglich, die Speichelchloridbestimmung als einen leicht durchführbaren und die Patienten nicht belästigenden Test bei Verdacht auf Mucoviscidose durchzuführen. Andererseits ergibt sich die Möglichkeit, durch die hier angegebene Methode der Speichelchloridbestimmung die Verhältnisse auch beim Säugling besser zu untersuchen und so vielleicht, wie Kaiser (2o) erwägt, zu signifikanten Ergebnissen zu gelangen.

Die Ultramikromethode eignet sich auch zur Chloridbestimmung des Schweißes. Erste Versuche in dieser Richtung brachten eine Zunahme der Genauigkeit und Erleichterung des Arbeitsganges. Es ist vorgesehen, dieser Frage weiter nachzugehen.

Zusammenfassung

Die Calcium - und Chloridtitration nach der Ultramikromethode von M.C.Sanz wurde auf ihre Verwendbarkeit in der Kinderklinik untersucht.Zunächst wurden anhand der Literatur die Besonder - heiten der Ultramikroanalyse und des verwendeten Systems be - sprochen und die eigenen Erfahrungen bei der Anwendung mitgeteilt. Die Genauigkeit der Methode wurde durch Reihentitrationen wäßriger Eichlösungen und eines Laborstandards ("Labtrol") und durch Mehrfachbestimmungen im Serum untersucht.Die Variationskoeffizienten lagen bei der Calciumtitration im Normalbereich zwischen 1,1 und 1,3%,bei der Chloridtitration im Normalbereich zwischen o,8 und 1,1%.Die Übereinstimmung der gefundenen Werte mit den Sollwerten der Eichlösung oder des Standards war gut.Beim Vergleich der Ultramikromethode mit einer Laborstandardmethode waren keine signifikanten Unterschiede zu ermitteln.Der Vergleich zwischen den Werten des venösen und des kapillären Blutes ergab beim Calcium Übereinstimmung;beim Chlor lagen die Werte in 7 von 1o Fällen im kapil - lären Blut signifikant höher als im venösen Blut;dieses Ergebnis wurde diskutiert.

Die Normalwerte der Methode wurden an 5o bzw.63 Säuglingen und Kindern untersucht.Als Mittelwert und mittlere quadratische Abweichung wurden errechnet:

beim Calcium	4,87	±	o,18 mVal/l
beim Chlor	1o7,5	±	3,1 mVal/l

Die Ergebnisse wurden mit Werten aus der Literatur verglichen. Außerdem wurde die Verwendbarkeit der Chloridtitration für mehrtägige Verlaufskurven an 3 mit Aletosal ernährten Kindern untersucht und die Methode für die Bestimmung der Speichelchloride beim Säugling angewandt.Dabei ergab sich eine der Serumtitration entsprechende Genauigkeit und bei Säuglingen ein Speichelchlorgehalt von 42,2 ± 24,o mVal/l.Das Ergebnis wurde im Vergleich zu Angaben aus der Literatur und im Hinblick auf die Diagnose der Mucoviscidose diskutiert.

Die Ultramikromethode zur Titration von Calcium und Chlor ist wegen ihrer Genauigkeit und leichten Durchführbarkeit,allgemein wegen ihres geringen Aufwandes an Probemengen für die Kinderklinik besonders zu empfehlen.

Vor allem möchte ich Herrn Professor Dr.med Gerhard Weber für den Arbeitsplatz im Labor der Kinderpoliklinik danken.

Besonderer Dank gilt Herrn Oberarzt Dr.med Dietrich Vogt für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung bei dieser Arbeit.

Literaturverzeichnis

1. Anderegg,G.,Flaschka,H., Sallman,R.,Schwarzenbach,G.: Metallindikatoren VII.Ein auf Erdalkaliionen ansprechendes Phthalein und seine analytische Verwendung. Helv.Chimica Acta 37, 113 (1954)

2. Anders,J.T. : Physiologic Chloride Level of the Saliva. J.appl.Physiol. 8, 659 (1955)

3. Bang,I. : Mikromethoden zur Blutuntersuchung. München 192o

4. Bakwin,H.,Bakwin,R.M. : Seasonal Variations in the Calcium Content of Infants' Serum. Am.J.Dis.Child. 34, 994 (1927)

5. Bakwin,H.,Bakwin,R.M. : Factors Influencing the Calcium Concentration in the Serum of Newborns. Am.J.Hyg. 15, 766 (1932)

6. Biedermann,W. Schwarzenbach,G. : Die komplexometrische Titration der Erdalkalien und einiger anderer Metalle mit Erichromschwarz T. Chimia 2, 56 (1948)

7. Brandt-Rehberg,P. : A Method of Microtitration. Biochem.J. 19, 27o (1925)

8. Brock,J. : Biologische Daten für den Kinderarzt. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954

9. Dancis,J.,Grobow,E., Boyer,A. : The Chloride Concentration of Saliva and Sweat in Infancy. J.Pediat. 5o, 459 (1957)

1o. Diehl,H.,Ellingboe,J.L. : Indicator for Titration of Calcium in Presence of Magnesium Using Disodium Dihydrogen Ethylendiamine Tetraacetate. Analyt.Chemistry 28, 882 (1956)

11. Dubsky,J.V.,Trtilek,J. : Mikromaßanalyse unter Benützung von Diphenylcarbacid und Diphenylcarbazon als Indikator. Mikrochemie 6, 315 (1933)

12.Dubsky,J.V.,Trtilek,J. : Verwendung der Merkurimetrie für die Silberbestimmung.
Z.anal.Chem. 93, 345 (1933)

13.Fanconi,G.,Rossi,E., Prader,A. : Recentes acquisitions dans le domaine de la Fibrose pancreatique avec bronchiectasies.
Schw.med.Wschr. 86, 1187 (1956)

14.Fanconi,G.,Wallgren,A. : Lehrbuch der Pädiatrie
Basel-Stuttgart 1961

15.G ebelein,Heite : Statistische Urteilsbildung.
Berlin-Göttingen-Heidelberg 1951

16.Gamble,J.L. : Chemical Anatomy,Physiology and Pathology of Extracellular Fluid.
Cambridge,Mass. 1954

17.Hellmuth,K. : Untersuchungen über den Calciumgehalt des mütterlichen und fötalen Blutserums.
Klin.Wschr. I, 454 (1925)

18.Jeanneret,P., Rosenmund,H.Essellier,A.F. : Wasser- und Elektrolythaushalt. Tabellen medizinisch wichtiger Zahlenwerte.
Helv.med.Acta 21, 191 (1954)

19.Johnson,W.H. : Salivary Electrolytes in Fibrocystic Disease of the Pancreas.
Arch.Dis.Childh. 31, 477 (1956)

2o.Kaiser,E.,Kunstadter R.H. Mendelson,R.S. : Electrolyte Concentrations in Sweat and Saliva.
Am.J.Dis.Child. 92, 369 (1956)

21.Keller,W.,Wiskott,A. : Lehrbuch der Kinderheilkunde.
Stuttgart 1961

22.King,E.J.,Wootton,I.D.P. : Micro-Analysis in Medical Biochemistry.
London 1956

23.Kirk,P.L. : Quantitative Ultramicroanalysis.
New York 195o

24.Kolthoff,Stenger : Volumetric Analysis Vol.I.
New York 1942

25.Leicher,H. : Der Calciumgehalt des menschlichen Blutserums und seine Beeinflussung durch Störungen der inneren Sekretion.
Dtsch.Arch.klin.Med. 141, 85 (1922)

26.Levy,M. : Beiträge zur encymatischen Histochemie.Mikromethode zur Bestimmung von Stickstoff.
Z.physiol.Chemie 24o, 33 (1936)

27.Lickint,F. : Die normale Zusammensetzung des menschlichen Gesamtblutes und des Blutserums.
Münch.Med.Wschr. 21, 888 (193o)

28.v.Liebig J. : Über einige Harnstoffverbindungen und eine neue Methode zur Bestimmung von Kochsalz und Harnstoff im Harn.
Ann.Chem. 85, 289 (1853)

29.Linderstrøm-Lang,K., Holter,H. : Beiträge zur enzymatischen Histochemie I.Über die Bestimmung kleiner enzymatischer Spaltungen.
Z.physiol.Chemie 2o1, 9 (1931)

3o.Marx,H. : Arzt und Laboratorium.
Stuttgart 1947

31.Mathis,H. : Beiträge zur Chemie des Speichels III.Über den Gehalt des gemischten Mundspeichels an den Kationen Kalium,Kalcium und Natrium,sowie an den Anionen:Chlor und Phosphor.
Ztschr.Stomat. 32, 1188 (1934)

32.Mc Grady,K.,Bessman,S.P. : The Detection of Mucoviscidosis by the Determination of Saliva Chloride.
Am.J.Dis.Childh. 9o, 61o (1955)

33.Nelson W.E. : Textbook of Pediatrics.
Philadelphia-London 1959

34.Opitz,H. : Zur Frage des Chlorhaushaltes bei exsudativen Kindern.
Mschr.Kinderheilk. 26, 288 (1923)

35.Prader,A.,Gautier,E., Gautier,R.,Naef,D. : Die Na- und K-Konzentration im gemischten Speichel.
Helv.paed.acta C 1o, 29 (1955)

36.di Sant'Agnese,P.A. : Fibrosystic Disease of the Pancreas, a Generalised Disease of Exocrine Glands.
J.Am.Med.Assos. 16o, 846 (1956)

37.di Sant'Agnese,P.A.,Shea,E. Darling,R.C.,Perera,G.A. : Abnormal Electrolyte Composition of Sweat in Cystic Fibrosis of Pancreas;Clinical Significance and Relationship to Disease.
Pediatrics 12, 549 (1955)

38.di Sant'Agnese P.A., Grossman,H.,Darling,R.C., Denning,C.R. : Saliva,Tears and Duodenal Contents in Cystic Fibrosis of the Pancreas.
Pediatrics 22, 5o7 (1958)

39.di Sant'Agnese,P.A., Vidaurreta,A.M. : Cystic Fibrosis of the Pancreas.
J.Am.med.Assos. 172, 2065 (1960)

40.Sanz,M.C. : Physiko-chemische Grundlagen und apparative Neuentwicklungen in der quantitativen Ultramikroanalyse.
Chimia 13, 192 (1959)

41.Sanz,M.C. : Ultramicro Methods and Standardisation of Equipment.
Clin.Chem. 3, 406 (1957)

42.Schales,O.,Schales,S. : A Simple and Accurate Method for the Determination of Chloride in Biological Fluids.
J.Biol.Chem. 140, 879 (1941)

43.Schober,W. : Die Schwankungen des Chlorspiegels im Gesamtblut und im Blutserum des Säuglings in ihrer Abhängigkeit von der Magensaftsekretion.
Monatsschr.Kinderh. 26, 297 (1923)

44.Scholander,P.F. : Scientific Apparatus and Laboratory Methods.
Science 95, 177 (1942)

45.Schultze-Jena,B.S. : Zur Diagnose der Pankreasfibrose.
Ztschr.Kinderheilk. 81, 589 (1958)

46.Schwarzenbach,G., Ackermann,H. : Komplexone V.Die Äthylendiamintetraessigsäure.
Helv.Chim.Acta 30, 1798 (1947)

47.Schwarzenbach,G., Gysling,H. : Murexid als Indikator auf Ca und andere Metallionen.
Helv.Chim.Acta 32, 1314 (1949)

48.Siwe,St. : Zur Kenntnis der blutchemischen Veränderungen bei parathyreopriver Tetanie und bei Zuführung von Parathormon.
Ztschr.Kinderheilk. 57, 383 (1935)

49.van Slyke,D.D.,Cullen,G.E. : Studies of Acidosis I.
J.Biol.Chem. 30, 289 (1917)

50.Snively,W.D.,Sweeney,M.J. : Elektrolyt- und Wasserhaushalt.
München-Berlin 1958

51.Sobel,A.E.,Hanok,A. : Ultra Micro Quantitative Analysis in Clinical Laboratories.
Mikrochemie 39, 51 (1952)

52.Sobel,A.E.,Hanok,A. : A Rapid Method for the Determination of Ultramicro Quantities of Calcium and Magnesium.
Proc.Soc.Experim.Biol.77,737(1951)

53.Thaysen,J.H.,Thorn,N.A., Schwartz,J.L. : Excretion of Sodium,Potassium, Chloride and Carbon Dioxide in Human Parotid Saliva.
Am.J.Physiol. 178, 155 (1954)

54.Todd,W.R.,Chuinard,E.G., Wood,M.T. : Blood Calcium and Phosphorous in the Newborn.
Am.J.Dis.Childr. 57, 1278 (1939)

55.Török,G.,Neufeld,L. : Über den Chlorgehalt des kapillären und venösen Vollblutes und Serums im Säuglingsalter.
Arch.Kinderheilk. 1o2, 217 (1934)

56.Volhard,J. : Über eine neue Methode zur maßanalytischen Bestimmung des Silbers.
Journ.prakt.Chemie NF 9,217 (1874)

57.Volhard,J. : Anwendung des Schwefelcyanammoniums in der Maßanalyse.
Annalen Chemie 19o, 1 (1878)

58.White,A.G.,Entmacher,P.S., Rubin,G.,Leiter,L. : Physiological and Pharmacological Regulation of Human Salivary Electrolyte Concentrations;with a Discussion of Electrolyte Concentrations of Some Other Exocrine Glands.
J.Clin.Invest. 34, 246 (1955)

59.Widmark,E.,Örskov,S.L. : Eine neue Mikrobürette.
Biochemische Ztschr.2o1, 15(1928)

LEBENSLAUF

Am 10.3.1937 wurde ich, Wolfgang Schreml, als drittes Kind des prakt. Arztes Dr. Paul Schreml und seiner Ehefrau Klara, geb. Benz, in Hof/Saale geboren.
An meinem Heimatort Kirchenlamitz besuchte ich vier Jahre die Volksschule. Im November 1949 trat ich in das Humanistische Gymnasium Metten über, wo ich im Juni 1956 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1956/57 immatrikulierte ich mich als Student der Humanmedizin an der Universität München. Im Frühjahr 1959 legte ich in München die ärztliche Vorprüfung ab. Die ersten beiden Klinischen Semester hörte ich an der Universität Freiburg/Breisgau. Zum Sommersemester 1960 kehrte ich an die Universität München zurück, wo ich am 13. Juni 1962 mein Studium mit dem Staatsexamen abschloß.

München, 13.6.1962